Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Bestimmung, Eigenschaften und Hemmung der Thymidylat-Synthetase in normalen und pathologischen, insbesondere leukämischen myeloischen Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Volker Neef
aus Wien

1970

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Bestimmung, Eigenschaften und Hemmung der Thymidylat-Synthetase in normalen und pathologischen, insbesondere leukämischen myeloischen Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Volker Neef
aus Wien

1970

Gedruckt mit Unterstützung des
Kultusministeriums Baden-Württemberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Dozent Dr. W. Wilmanns
(Professor Dr.Dr. h.c. H.E. Bock)
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Frommhold

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

Meiner Frau

INHALTSÜBERSICHT

Seite

EINLEITUNG 1

METHODIK 7

ERGEBNISSE 17

Teil A : Eigenschaften der Thymidylat-Synthetase in unreifen myeloischen Zellen 17

I Abhängigkeit der Enzymaktivität von einzelnen Komponenten des Reaktionsgemisches 17

1. Enzymkonzentration 18

2. dUMP-Konzentration 19

3. Tetrahydrofolsäure (FH_4)-Konzentration .. 22

4. Einfluß von $NADPH+H^+$ 23

5. Synthetaseaktivität in Abhängigkeit von der FH_4-Konzentration bei Zusatz von $NADPH+H^+$ .. 25

6. Formaldehydkonzentration 26

II Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Inkubationszeit 27

III pH-Optimum 28

IV Stabilität des Enzyms 30

Teil B : Wirkung verschiedener Hemmfaktoren auf die Thymidylat-Synthese 33

I 5-Fluor-Uracilderivate 33

II Nicht fluorierte Pyrimidinderivate 41

III Amethopterin (Methotrexat^R) 43

IV Einfluß weiterer cytostatisch wirkender Substanzen 46

V Wirkung von Normalserum und von Cytolysat ausgereifter Leukocyten 48

Seite

Teil C : Thymidylat-Synthetaseaktivität in weißen Blutzellen und im Knochenmark unter normalen und pathologischen Bedingungen 48

Teil D : Therapeutische Beeinflussung der Thymidylat-Synthetase 58

DISKUSSION 67

1. Optimale Reaktionsbedingungen der Thymidylat-Synthetase 68
2. Bedeutung der Aktivierung und Hemmung des Folat-Reductasesystems für die Thyminnucleotid-Synthese 70
3. 5-Fluor-Uracilderivate und deren Hemmechanismus 73
4. Einfluß physiologischer Verbindungen auf den dUMP-Umsatz 79
5. Enzymchemische Deutung morphologischer Befunde 81
6. Enzymaktivitätsbestimmungen als Therapiekontrolle 85

ZUSAMMENFASSUNG 90

ANHANG 92

LITERATUR 99

E I N L E I T U N G

Da die Chromosomen, die Träger genetischer Eigenschaften, normalerweise die Fähigkeit zur Auslösung von Merkmalen, identischen Reduplikation und Mutation besitzen, kommt dem chemischen Substrat dieser Funktionen, nämlich der Desoxy= ribonukleinsäure, eine außerordentliche Bedeutung zu. Im Falle einer DNS-Synthesehemmung ist die Zelle nicht mehr in der Lage, sich zu teilen, verfügt jedoch noch über die Potenz der genetischen Information, die ihr die zum Wachs= tum erforderliche spezifische Enzym- und Proteinsynthese weiterhin gestattet, da die RNS-Bildung nicht eingeschränkt zu sein braucht (22,57).

Die Beobachtung, daß in schnell proliferierenden Geweben wie dem normalen Knochenmark, den Keimzellen oder den Schleimhautepithelien der DNS-Umsatz im Gegensatz zu Gewe= ben mit niederer Mitoserate beschleunigt, in gut- und vor= allem bösartigen Geschwülsten jedoch pathologisch, offenbar unkontrolliert abläuft, läßt die Existenz von Regulations= mechanismen der DNS-Biosynthese möglich erscheinen. Bei Experimenten, die eine derartige Regulation wahrscheinlich zu machen versuchten, zeigte sich, daß die DNS-Synthese in Abhängigkeit von der Bereitstellung von Desoxythymidin= monophosphat (dTMP) bzw. Komponenten der Thymidylat-Synthetasereaktion (Gleichung 1) fördernden oder limi= tierenden Einflüssen unterliegt (27). FLAKS und COHEN (27) haben durch Experimente an E.coli eine direkte Korrelation zwischen der DNS-Synthese und der Thymidylat-Synthetase= aktivität gefunden. Diese Zusammenhänge leuchten ein, wenn man bedenkt, daß nur die DNS im Gegensatz zur RNS die Pyri= midinbase Thymin besitzt und zu ihrer Synthese benötigt. Das Thymin wird in Form von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) zusammen mit den Triphosphaten des Adenosins, Guanosins und Cytidins in einer von der DNS-Polymerase

katalysierten Reaktion in die DNS eingebaut (50) (Abb.1). Somit hat die Thymidylatsynthese sicherlich die Bedeutung einer Schlüsselreaktion, die zugleich eine regulierende Funktion auf die DNS-Biosynthese ausübt (O'BRIEN 1962 (58)). Es besteht jedoch weiterhin die Frage, welche Möglichkeit die Zelle hat, diese Regulation zu kontrollieren, da offenbar die dTMP-Synthetasereaktion nur als Instrument einer übergeordneten Kontrolle zu verstehen ist.

Die Zelle verfügt prinzipiell über zwei Möglichkeiten, das für die DNS-Synthese so wichtige Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) bereitzustellen :

1. Durch Phosphorylierung von Thymidin, katalysiert durch die Thymidin-Kinase (7,8,61,71,77).
2. Durch die Thyminmethylgruppen-de novo-Synthese, bei der ebenfalls dTMP entsteht (Gleichung 1).

Inwieweit die Zelle von der ersten Möglichkeit Gebrauch macht, ist von der vorliegenden Enzymmenge und den jeweiligen Enzymeigenschaften abhängig, ferner von der Hemmung (17,18,42,77) der Thymidin-Kinase durch das Endprodukt der Phosphorylierungsreaktionen (dTTP) (Abb. 1) und von der ausreichenden Bereitstellung von Thymidin.
Von zentraler Bedeutung ist zweifellos der zweite Syntheseweg, der in unmittelbarer Beziehung zum Folsäure-"C_1"-Stoffwechsel (Abb. 1) steht.

(1) $$dUMP + N^5,N^{10}\text{-}5,6,7,8\text{-methylen-}FH_4 \xrightarrow[\text{Synthetase}]{\text{Thymidylat-}} dTMP + 7,8\text{-}FH_2$$

Diese Reaktion (Gleichung 1), mit der sich vorallem FRIEDKIN und WAHBA (28,69), aber auch BLAKLEY und McDOUGALL (13) auseinandersetzten, beinhaltet sowohl die Methylierung von dUMP als auch eine Oxydierung der aktiven Tetrahydro=

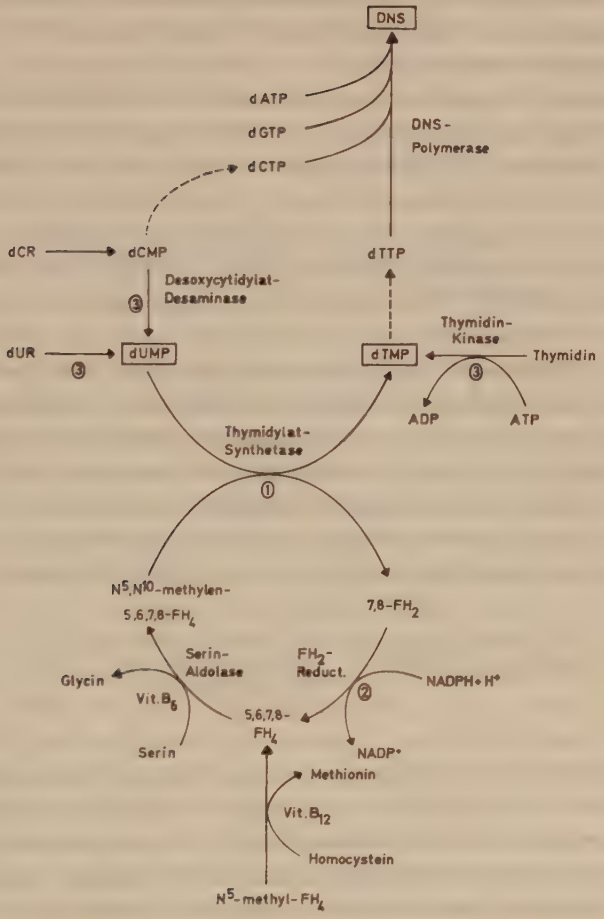

Abb.1: Die Thymidylat-Synthetasereaktion und benachbarte Stoffwechselwege. ① : Hemmung durch 5-Fluor-Uracil und dessen Derivate. ② : Hemmung durch Folsäure-antagonisten. ③ : Hemmung durch dTTP. Unterbrochene Pfeile bedeuten nicht eingezeichnete Zwischenreaktionen. Erläuterung der Symbole siehe unter "Abkürzungen".

folsäure (FH_4) zur inaktiven Dihydrofolsäure (FH_2). N^5, N^{10}-methylen-FH_4, der "aktivierte Formaldehyd" (45,67), wirkt sowohl als "C_1"-Überträger (32,76) als auch als Wasserstoff-Donator (55,64).
Die aktiven Folsäure-Coenzyme werden im Zellstoffwechsel zur Bildung des Thymins und auch zur Synthese von Purinringen benötigt und spielen daher besonders bei den Zellteilungs- und Reifungsvorgängen eine erhebliche Rolle. Daß aber die Folsäure bei der Neubildung von Thyminmethylgruppen eine gewisse Sonderstellung einnimmt, mag man daran erkennen, daß die Thymidylat-Synthetasereaktion die einzige ist, die Tetrahydrofolsäure nicht nur in katalytischen Mengen, sondern in Substratkonzentrationen erfordert (13, 58). Der ausreichenden Bereitstellung kommt in schnell sich teilenden Geweben eine besonders große Bedeutung zu (O'BRIEN (58)). Die Blockierung der Regeneration des aktiven Folat-Coenzyms durch Folsäureantagonisten (Gleichung 2) kann bereits zu einer Drosselung des DNS-Umsatzes und damit zu einer Mitosehemmung führen.

(2) $7,8\text{-}FH_2 + NADPH+H^+ \xrightarrow[FH_2\text{-Reductase}]{} 5,6,7,8\text{-}FH_4 + NADP^+$

Die Thymidylat-Synthetase, die eine um ein Vielfaches niedrigere Aktivität als die Dihydrofolsäure-Reductase besitzt, gilt als limitierendes Enzym in dem Cyclus, der von den beiden genannten Enzymen unterhalten wird (Abb.1) (58,67). Dieser Befund spricht ebenfalls für eine regulative Funktion der Thymidylat-Synthetase bei der DNS-Synthese. (Folsäureantagonisten wie Aminopterin oder Amethopterin hemmen die FH_2-Reductase (5,31,75,78,81), die dadurch zum limitierenden Enzym werden kann (5,74,78).)

Biosynthetisch erfolgt die Bildung des "aktivierten Form-

aldehyds" in einer Vitamin B_6-abhängigen Reaktion, die durch die Serin-Aldolase katalysiert wird. Dabei entsteht aus Serin und FH_4 → Glycin und "aktivierter Formaldehyd" (2, 43,49). In vitro (45) kann die Synthese von Methylen-FH_4 enzymunabhängig erreicht werden : (es sei aber erwähnt, daß die chemisch synthetisierte Verbindung nur halb so aktiv ist wie die biosynthetisch erhaltene (11) .)

(3) $5,6,7,8\text{-}FH_4 + CH_2(OH)_2 \longrightarrow N^5,N^{10}\text{-}5,6,7,8\text{-}$
$\text{-methylen-}FH_4 + 2\ H_2O$

Um die Aktivität der Thymidylat-Synthetase qualitativ und quantitativ erfassen zu können, sind eine Anzahl von Methoden entwickelt worden, die mehr oder weniger voneinander abweichen, im Prinzip aber von den stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten der Synthetasereaktion ausgehen. Bei dieser Reaktion handelt es sich um die Übertragung einer Einkohlenstoffeinheit auf C_5 des Pyrimidinringes von dUMP und um deren Reduktion zur Methylgruppe, womit eine Oxydation der Tetrahydrofolsäure einhergeht. FRIEDKIN (29) hat die von verschiedenen Wissenschaftlern angewandten Methoden in einem Überblick zusammengestellt und deren Vor- und Nachteile gegeneinander abgewogen. Nach SMITH LOMAX und GREENBERG (52) lassen sich diese Verfahren in zwei Typen einteilen :

1. Benutzung markierten Substrates und anschließende Isolierung des radioaktiven Thymidylats durch Chromatographie : Als radioaktive Isotope wurden Tritium (HARTMANN und HEIDELBERGER (37), PASTORE und FRIEDKIN (60) und HÄGGMARK (35)), ^{32}Phosphor (FRIEDKIN und KORNBERG (30), WAHBA und FRIEDKIN (69), BLAKLEY und McDOUGALL (13)) und ^{14}Kohlenstoff (FLAKS und COHEN (27), McDOUGALL und BLAKLEY (56)) benutzt.
2. Spektrophotometrische Methode nach WAHBA und FRIEDKIN

(69,70), die den Absorptionswechsel bei 338 mμ während der Oxydation von FH_4 zu FH_2 zur Grundlage hat (Gleichung 1).

Von SMITH und GREENBERG (68) wurde ein Test entwickelt, der zwar auch im Rahmen der Synthetasereaktion zu verstehen ist, methodisch jedoch von den bisher angewandten Verfahren abweicht und somit neben den beiden schon genannten einen eigenen Typ darstellt.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit erfolgten auf der Basis dieser im anschließenden Teil beschriebenen Methode, die sich bei Enzymbestimmungen in Rohextrakten oder Zellhomogenaten bewährt haben soll (47,52,63). Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Eigenschaften der Thymidylat-Synthetase in normalen und pathologischen, insbesondere leukämischen weißen Blut- und Knochenmarkzellen, die Prüfung verschiedener Verbindungen und cytostatischer Substanzen auf ihr Hemmvermögen in vitro und Ausarbeitung eines klinischen Routinetestes, durch den Rückschlüsse auf die therapeutische Wirksamkeit bzw. auf cytotoxische Nebenwirkungen im Verlaufe einer Chemotherapie ermöglicht werden.

A b k ü r z u n g e n

dUMP	=	2-Desoxyuridin-5'-monophosphat
dUR,dCR	=	2-Desoxyuridin, 2-Desoxycytidin
dTMP	=	2-Desoxythymidin-5'-monophosphat
dTTP	=	2-Desoxythymidintriphosphat
dCTP,dATP,dGTP	=	2-Desoxycytidin-,-adenosin-,-guanosintriphosphat
ADP,ATP	=	Adenosindi-,-triphosphat
FH_2,FH_4	=	Dihydro-, Tetrahydrofolsäure
NADPH + H^+	=	Reduz. Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
DNS,RNS	=	Desoxyribonukleinsäure, Ribonukleinsäure

M E T H O D I K

I Bezug der Materialien :

Folsäure, 5-Fluor-Uracil, 5-Fluor-Desoxyuridin und 5-Fluor-Desoxyuridinmonophosphat (Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzach). dUMP-5-^{3}H, dUMP, dTMP, dTTP und dCTP (Calbiochem, Los Angeles). NADPH+H^{+} (Natriumsalz) (Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim). Norit A (Aktivkohle aus Holz) (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg). Amethopterin (Methotrexat^{R}) und Triäthylenthiophosphoramid (Thio-TEPA) (Lederle, Cyanamid GmbH, München). Vinblastinsulfat (Velbe^{R}) und Vincristinsulfat (Oncovin^{R}) (Eli Lilly, Giessen). Prednisolon (Hostacortin-H^{R}) und Triäthylenmelamin (TEM) (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt). 16-alpha-methyl-9-alpha-fluor-prednisolon bzw. Dexamethason (Fortecortin^{R}) (Merck, Darmstadt). Cytosinarabinosid (Mack, Illertissen). Cyclophosphamid (Endoxan^{R}) (Asta-Werke, Brackwede). Trisäthyleniminobenzochinon (Trenimon^{R}) (Bayer, Leverkusen).

II Substrate :

a) Radioaktives Desoxyuridin-5'-monophosphat-5-^{3}H : dUMP-5-^{3}H wurde als feste Substanz mit einer spezifischen Aktivität von 4,7 C/mMol und einer Gesamtaktivität von 1 mC bezogen. Nach Herstellung einer wässerigen Lösung von 60 µC/0,1 ml wurde diese durch Hinzufügen von nicht markiertem dUMP auf 4,5 x 10^{6} Impulse/µMol eingestellt und als solche bei den Enzymuntersuchungen verwendet. Die spezifische Aktivität dieser Substratlösung entsprach etwa derjenigen, die von KAMMEN (47) mitgeteilt wurde.

b) d,l-Tetrahydrofolsäure :
Die Herstellung beruhte auf einer von O'DELL (59) angegebenen, von JAENICKE und BRODE (44) modifizierten Methode, bei der die Hydrierung von Folsäure mittels eines Platinkatalysators in Eisessig erfolgt : Nachdem 30 mg PtO_2 in 10 ml Eisessig 15 min. lang in einer Schüttelapparatur vorhydriert worden sind, erfolgt die Zugabe von 100 mg Folsäure. Während des etwa 2-stündigen Vorgangs entsteht eine fast entfärbte Lösung, die im Anschluß daran unverzüglich vom Platin abzentrifugiert und in Peroxyd-freien Äther gegossen wird. Die hellcremefarben ausfallende Tetrahydrofolsäure wird 3 mal in Äther gewaschen und schließlich im Vakuum getrocknet. Das Präparat läßt sich bei -15°C im Dunkeln über mehrere Wochen stabil aufbewahren.

c) Dihydrofolsäure :
Die Darstellung erfolgte nach einer von WILMANNS (77) beschriebenen Methode, die sich an ein von FUTTERMANN (31) angegebenes und von BLAKLEY (10) modifiziertes Verfahren anlehnt. Die Reduktion der Folsäure geschah mit Natriumdithionit in ascorbinsaurer Lösung. Die Aufbewahrung der Verbindung war als Suspension in 0,005 n HCl bei 0°C im Dunkeln möglich.

III Isolierung und Cytolyse der weißen Blutzellen und der Knochenmarkzellen :

Die von WILMANNS (77) ausführlich beschriebene Methode ist hier zusammengefaßt :

a) Leukocyten :

1. 20-40 ml 1:10 mit 5 %igem Mg-Titriplex verdünntes venöses Blut 30 min. lang bei 37°C sedimentieren lassen.

Die folgenden Arbeitsgänge wurden bei 0 - 3°C durchgeführt.

2. Abpipettieren der überstehenden Leukocytenmanschette,

die Erythro- und Thrombocytenverunreinigungen enthält und anschließend zentrifugieren bei 175 g.

3. Sediment 3 min. lang in 0,83 %iger NH_4Cl hämolysieren, dann zentrifugieren.
4. Dreimaliges Waschen mit calciumfreier Ringer-Phosphat-Glucose-Lösung.
5. Letztes Sediment (eingestellt auf etwa 10^8 Zellen/ml) in 10^{-3}m Kaliumphosphatpuffer (pH=7,4) suspendieren und 1 Std. der Cytolyse überlassen.
6. Abtrennung der Zellstromata durch Zentrifugieren (30 min. bei 38 000 g).
7. Enzymaktivitätsbestimmungen aus dem Überstand.

b) Knochenmarkzellen :

1. Aspiriertes Sternalmark (silikonisierte Spritze) sofort nach der Punktion in eine eisgekühlte Mischung aus Ringer-Phosphat-Glucose-Lösung und 5 %igem Mg-Titriplex (pH=7,4) überführen.
2. 10 min. in der Kühlzentrifuge bei 150 g zentrifugieren. Hämolyse der Erythrocyten, Isolierung und Cytolyse der kernhaltigen Zellen werden wie unter III a) angegeben durchgeführt.

IV Proteinbestimmungen :

Der Substratumsatz/min. wurde nicht nur auf die Zellzahl, sondern auch auf den Proteingehalt bezogen. Letzterer wurde nephelometrisch nach BÜCHER (20) bestimmt.

V Enzymaktivitätsbestimmungen :

Die Bestimmung der Thymidylat-Synthetase erfolgte in Anlehnung an eine von SMITH und GREENBERG (68) entwickelte, von ROBERTS (63) und KAMMEN (47) modifizierte Methode.

SMITH und GREENBERG arbeiteten mit einem am Uracil-C_5 (Abb. 2) Tritium-markierten dUMP. Das Tritiumatom wird bei der Übertragung des Methylenkohlenstoffs von ^5N, ^{10}N-

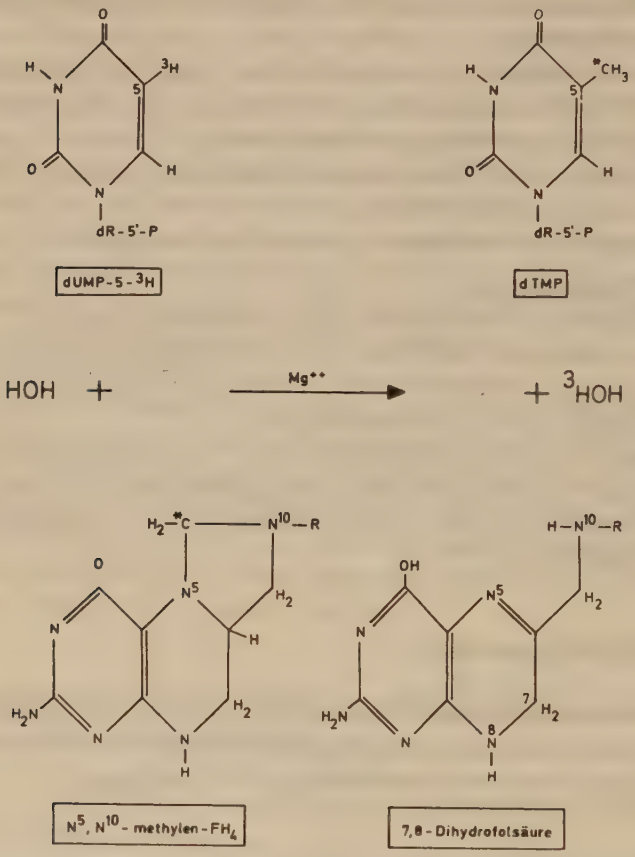

Abb.2: Thymidylat-Synthetasereaktion. Verdrängung des Tritiumatoms (^3H) aus dUMP-5-^3H durch die übertragene Methylgruppe* und Übertritt des Isotops ins Wasser. dR-5'-P: Desoxyribose-5'-phosphat. R: Benzoyl-Glutaminsäurerest. (In Anlehnung an LOMAX SMITH und GREENBERG (52).)

methylen-FH_4 auf das C_5 des dUMP gegen die sich bildende Methylgruppe ausgetauscht und setzt sich als Proton (H.O. KAMMEN) mit den umgebenden Wasserionen ins Gleichgewicht. Die Radioaktivität des im Wasser gelösten Tritiums kann, nachdem letzteres von dem restlichen, nicht umgesetzten dUMP-5-^3H isoliert worden ist, in Imp./min. gemessen werden. Die Austauschrate des Tritiums stellt ein spezifisches und empfindliches Maß für die Enzymaktivität bzw. die Neusynthese von Thyminmethylgruppen dar.
Während SMITH und GREENBERG die Trennung des nicht umgesetzten dUMP-5-^3H von dem abgespaltenen Tritium in einem relativ komplizierten Sublimationsprozeß vornahmen, verfuhren ROBERTS und auch KAMMEN anders : Sie erreichten die Trennung durch Adsorption von dUMP-5-^3H an aktive Kohle bzw. Norit A und anschließendes Abzentrifugieren bzw. Abfiltrieren des Adsorptionskomplexes. Der Überstand bzw. das Filtrat wurde zur Impulszählung herangezogen. Diese Art der Trennung des dUMP-5-^3H vom Tritium-haltigen Reaktionsgemisch wurde auch in der vorliegenden Arbeit bevorzugt.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in der Regel unmittelbar im Anschluß an die Cytolyse der Blut- und Knochenmarkzellen, obwohl eine ein- bis mehrtägige Verzögerung, vorausgesetzt das Enzym blieb bei -15°C aufbewahrt, mit einem nur unerheblichen Aktivitätsverlust einherging (s. unter Ergebnisse). Die spezifischen Enzymaktivitäten sind in mµMol/min./10^{10} Zellen bzw. mµMol/h/mg Protein bei einer Inkubationstemperatur von 37°C angegeben.

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml (wenn nichts anderes angegeben ist) :

1. 33,75 mµMol d,l-FH_4 (gelöst in 9 Teilen 0,05 m $KHCO_3$ und 1 Teil 3 m Mercaptoäthanol. Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.)
2. 0,6 µMol $NADPH+H^+$ (gelöst in 0,05 m $KHCO_3$. Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt.)

3. 10 µMol TRIS (pH=7,2)
4. 30 µMol Mercaptoäthanol
5. 4 µMol $MgCl_2$
6. 4 µMol Mg-Titriplex
7. 1 µMol Formaldehyd
8. 6,5 mµMol dUMP-5-^{3}H
9. Cytolysat von 4 - 7 x 10^6 Zellen

(Kontrollansätze enthielten außer dem Enzym alle angegebenen Komponenten.)
Während die Aufbewahrung der Komponenten 2.-7. bei Kühlschranktemperatur (2-4°C) möglich war, erfolgte die der Cytolysate und der radioaktiven dUMP-5-^{3}H-Lösung bei -15°C in eingefrorenem Zustand. d,l-FH_4 wurde in pulverisierter Form ebenfalls bei -15°C aufbewahrt.

Die Ansätze wurden 60 min. lang (wenn nichts anderes angegeben ist) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen einer gleichen, dem Ansatzvolumen entsprechenden Menge Norit A-Suspension (1,25 g/ 10 ml) gestoppt, indem das bei der Reaktion nicht umgesetzte Substrat (dUMP-5-^{3}H) an die Kohle adsorbiert wurde. Daß der Substratumsatz nach Hinzufügen der substratbindenden Kohle unterbrochen wird, ließ sich durch Versuche zeigen, bei denen jeweils nach verschieden langer Einwirkungszeit von Norit A die Enzymaktivitätsmessungen erfolgten. Das Enzym stammte aus pathologischen weißen Vorstufen eines Patienten mit akuter Leukämie. Die doppelt bestimmten Aktivitäten sind aus Tabelle 1 ersichtlich. In der obersten Reihe der Tabelle sind die Impulswerte aufgeführt, die nach einer 1-minütigen Einwirkung von Norit A gemessen wurden (Sofortwert). Die Sedimentation der Kohlepartikelchen wurde durch Aufschütteln verhindert. Die übrigen Werte wurden nach längeren Einwirkungszeiten von Norit A bestimmt. Die Abweichung dieser Impulswerte gegenüber dem 1-Minutenwert (Sofortwert) kann als gering erachtet werden, zumal sie nicht größer als die Schwankungsbreite der Doppelbestimmun-

gen ist. Diese Untersuchungen zeigten, daß die Thymidylat-Synthese, die ohne Norit A in den Inkubaten weiter ablief (2-stündige Inkubationszeit, unterste Reihe von Tab.1), nach Zugabe von aktiver Kohle zum Stillstand kommt.

Inkubations= zeit (min.)	Einwirkungszeit von Norit A (min.)	Doppelbestimmungen (Imp./min.)	
60	1	3512	3496
	5	3500	3454
	10	3482	3502
	15	3520	3488
	30	3516	3524
	60	3490	3510
120	30	7118	7076

Tab.1: Beendigung der Thymidylat-Synthetasereaktion durch Norit A. Adsorption des nicht umgesetzten Substrats an die aktive Kohle. (Pat. Be., akute Leukämie)

Norit A adsorbierte über 99 % des angebotenen dUMP-5-^{3}H. Dieser Befund konnte durch Vergleich von Standardmessungen mit und ohne Norit A erhoben werden. Wie Abb. 3 zeigt, verlaufen sowohl die ohne Norit A als auch die in Anwesenheit von aktiver Kohle gemessenen Impulsraten in linearer Abhängigkeit von der dUMP-5-^{3}H-Konzentration. Aus der Abbildung ist außerdem ersichtlich, daß die prozentuale Adsorptionsintensität auch bei erheblich größeren als in den Ansätzen (3,25 x 10^{-5} M/l) verwendeten Mengen dUMP-5-^{3}H konstant bleibt. Zur Klärung der Frage, ob ein Träger die

Adsorption von dUMP-5-^{3}H an Norit A beeinflußt, wurde nicht markiertes dUMP in verschiedenen Konzentrationen im Anschluß an die Inkubation vor der Zugabe von Norit A den Ansätzen zugesetzt. Bei keiner Trägerkonzentration ließ sich eine Verbesserung der Adsorption erreichen.

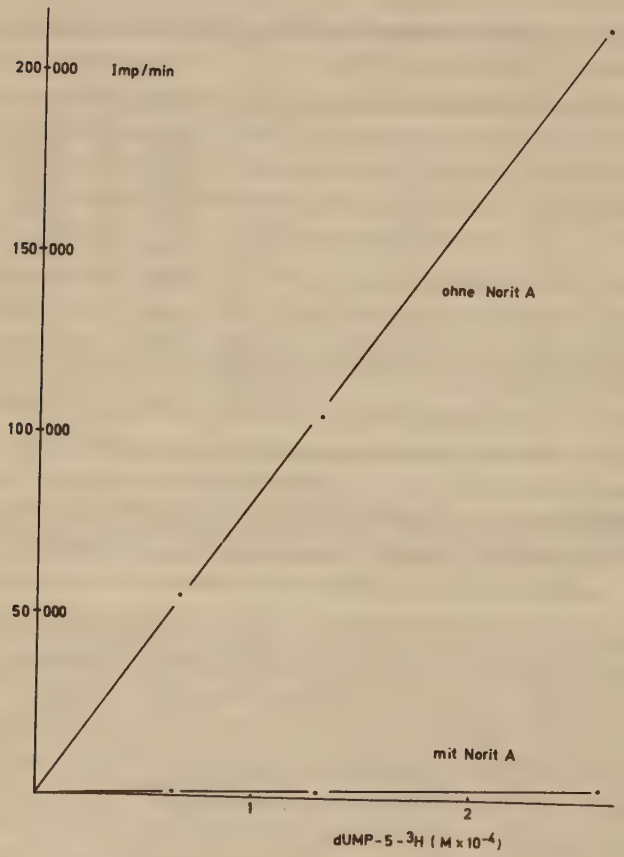

Abb.3: Standardisierung von dUMP-5-^{3}H mit und ohne Adsorption an Norit A.

Die Ansätze wurden 30 min. lang der Einwirkung von Norit A überlassen, wobei sedimentiertes Norit A wiederholt aufgeschüttelt wurde. Im Anschluß daran wurde die Suspension 6 min. lang bei 15 000 g zentrifugiert. Der Überstand (0,2 ml) wurde abpipettiert und in 15 ml Scintillatorlösung (4 g Diphenyloxazol und 100 mg 1,4-bis-2(5-Phenyloxazol)-Benzene in 1000 ml einer 2:1 Mischung aus Toluol und Äthanol gelöst) aufgenommen. Die Messung der Aktivität des im Wasser gelösten Tritiums erfolgte im TRI-CARB Liquid Scintillation Spectrometer (Fa. Packard Instrument Company). Die Bedeutung eines geeigneten Mediums zur Aktivitätsmessung geht aus Abb. 4 hervor. Die Benutzung einer

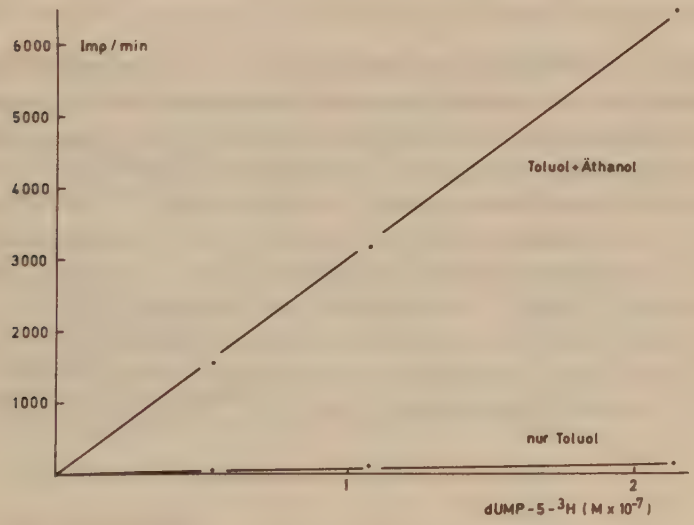

Abb.4: Einfluß der Scintillatorlösung auf die Impulsrate.

Toluol/Äthanol-Scintillatorlösung gegenüber einer Lösung, die nur Toluol enthielt, hatte eine 40-fache Steigerung der Impulsausbeute zur Folge.

Durch Standardisierung der Substratlösung ließ sich eine spezifische Aktivität von 4,5 x 10^6 Imp./min./µMol dUMP--5-^{3}H ermitteln. Regelmäßige Kontrollen, bei denen die Standardaktivität verschiedener dUMP-5-^{3}H - Konzentrationen gemessen wurde, ergaben, daß die radioaktive Lösung trotz wiederholten Auftauens und Einfrierens stabil blieb. Da die Aktivität des im Wasser gelösten Tritiums dem Substratumsatz bzw. der Enzymaktivität proportional ist, läßt sich die gebildete Menge Thymidylat aus den in den Inkubationsansätzen ermittelten Impulsraten und der spezifischen Aktivität des Vergleichsstandards berechnen :

$$\frac{\text{Imp./min. des Inkubationsansatzes}}{\text{Imp./min./mµMol dUMP}} = \text{mµMol gebildetes Thymidylat}$$

In welchem Maße die Enzymaktivitäten in zwei getrennt angesetzten Reaktionsgemischen mit identischen Cytolysaten voneinander abweichen, ergab eine statistische Auswertung von 50 Doppelbestimmungen. Die einzelnen Aktivitäten der Thymidylat-Synthetase bewegten sich zwischen 2,5 und 40,5 mµMol Substratumsatz/min./10^{10} Zellen. Die Differenz der doppelt bestimmten Enzymaktivitäten (x, y) vom jeweiligen Mittelwert ($\frac{x + y}{2}$) ergab die Einzelabweichung ($\pm$ a). Für n = 50 verschiedene Cytolysate wurde eine durchschnittliche Abweichung der Doppelwerte vom Mittelwert ($\frac{\Sigma \pm a}{n}$) von 0,12 mµMol Substratumsatz/min./10^{10} Zellen berechnet.

E R G E B N I S S E

T e i l A : Eigenschaften der Thymidylat-Synthetase in unreifen myeloischen Zellen.

I Abhängigkeit der Enzymaktivität von einzelnen Komponenten des Reaktionsgemisches.

Aus Tabelle 2 ist die Bedeutung verschiedener Komponenten für die Aktivität der Thymidylat-Synthetase in unreifen myeloischen Zellen ersichtlich (Markzellen eines Patienten

Ansatz	S.A.	Imp./min.	%
Kompletter Ansatz	27,1	8720	100
ohne Enzym	-	-	-
ohne $MgCl_2$	13,0	4196	48
ohne $MgCl_2$, ohne Mg-Titriplex	11,7	3760	43
ohne $MgCl_2$, ohne Mg-Titriplex, mit Titriplex	8,3	2628	30
ohne Mercaptoäthanol	9,5	3062	35
ohne Formaldehyd	2,4	784	9
ohne FH_4	0,068	22	0,25

Tab.2: Komponenten der Thymidylat-Synthetasereaktion in myeloischen Zellen. (S.A. = mµMol Substratumsatz/ min./10^{10} Zellen. Pat. Sch., akute Leukämie.)

mit akuter Leukämie). Die angegebenen Impulsraten sind auf einen Nullwert, der dem Kontrollansatz ohne Enzym entspricht, reduziert. In der Tabelle kommt die absolute Abhängigkeit der Enzymreaktion von Tetrahydrofolat und Formaldehyd, letztlich also von Methylen-FH_4, deutlich zum Ausdruck. Dieser Befund ergibt sich auch aus den Kurven der Abbildungen 7a), 9 und 10.
Wie entscheidend Mg^{++}-Ionen für die Aktivierung der Thymidylat-Synthetase sind, zeigen verschiedene in der Tabelle angegebene Versuchsanordnungen. Ohne $MgCl_2$ betrug die Aktivität lediglich ca. 50 % derjenigen eines kompletten Reaktionsgemisches. Wurde in dieses in seiner Aktivität ohnehin um die Hälfte reduzierte Reaktionsgemisch statt Mg-Titriplex nur Titriplex eingesetzt, so war ein Rückgang des Substratumsatzes um weitere 20 % die Folge.
Die Fähigkeit der Thiole, Tetrahydrofolsäure vor Oxydation zu schützen bzw. Methylen-FH_4 zu stabilisieren, nach BLAKLEY (11) außerdem als Enzymaktivator zu fungieren, wurde im Hinblick auf eine aktivitätssteigernde Wirkung untersucht. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, ließ sich unter Ausnutzung der FH_4-stabilisierenden Wirkung von 2-Mercaptoäthanol eine über 60 %ige Umsatzsteigerung erzielen.
Zu erwähnen ist noch eine in der Tabelle nicht aufgeführte Untersuchung über den Einfluß einer Albuminlösung auf die Enzymaktivität. Hierzu wurde eine 1,25 %ige Rinderalbuminlösung (0,01 M TRIS mit 0,25 M Saccharose als Lösungsmittel) hergestellt, von der 0,02 ml zum Inkubationsansatz gegeben wurden. Eine Aktivitätssteigerung, wie sie von ROBERTS (63) beschrieben wurde, ließ sich unter den angegebenen Bedingungen nicht erreichen.

1. Enzymkonzentration :

Die Untersuchungen erfolgten an den kernhaltigen Zellen des Knochenmarks bei einem Patienten mit akuter Leukämie. Während die Enzymkonzentration (Zellzahl) variiert wurde,

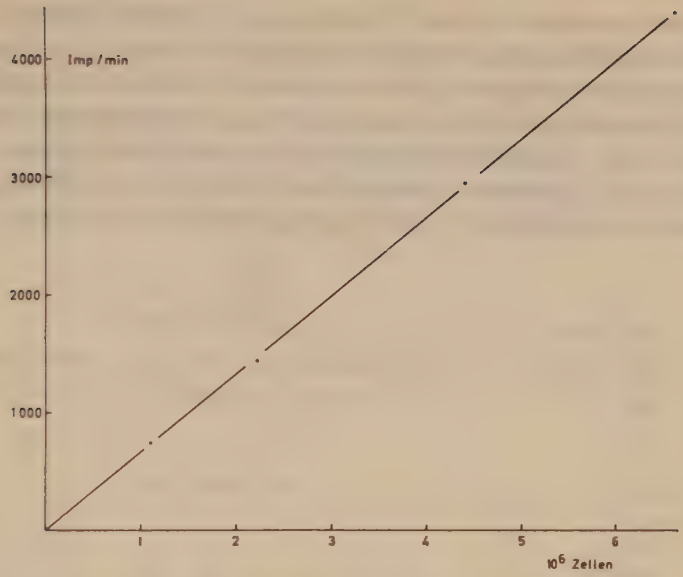

Abb.5: Thymidylat-Synthetaseaktivität in Abhängigkeit von der Zellzahl bzw. der Enzymmenge aus Cytolysat myeloischer Zellen. (Pat. Lo., akute Leukämie)

blieb die Konzentration der Substrate dUMP und Methylen-FH_4 konstant. Die Ansätze enthielten FH_4 im Überschuß (0,27 µMol/Ansatz), jedoch kein $NADPH+H^+$. Die übrigen Ansatz=komponenten entsprachen den bereits in der Methodik ge=schilderten Angaben. Wie aus Abb.5 hervorgeht, verhält sich die gebildete Menge dTMP proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration.

2. dUMP-Konzentration :

Bei diesen Versuchen, die mit Cytolysat von myeloischen Zellen aus einem Markpunktat eines Patienten mit akuter Erythroleukämie durchgeführt wurden, war die Enzymkonzen=tration konstant ($5,4 \times 10^6$ Zellen /Ansatz), die Substrat=menge hingegen variabel. Das Ergebnis dieser Untersuchungen

ist aus den Abb. 6a) und b) ersichtlich. Aufsteigende dUMP-Konzentrationen führten zu einer anfangs fast gerad= linigen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, die je= doch trotz weiterer Erhöhung der Substratkonzentration ähnlich dem Verlauf einer Hyperbel allmählich aufhörte (Abb. 6a)). dUMP-Konzentrationen über 9,75 x 10^{-5} M hatten keine weitere Aktivitätssteigerung zur Folge.

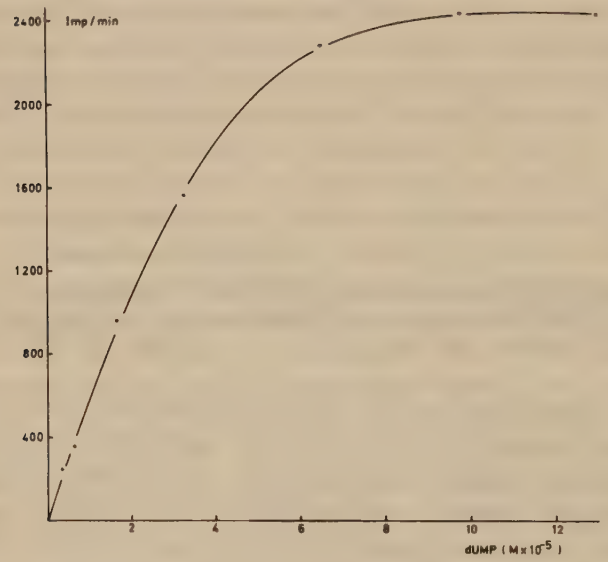

Abb.6a): Abhängigkeit der Thymidylat-Synthese von der Substratkonzentration (dUMP). (Pat. Br. , akute Erythroleukämie)

Abbildung 6b) zeigt die Bestimmung der maximalen Reaktions= geschwindigkeit (v_{max}) und der Dissoziationskonstanten (Michaeliskonstante) des dUMP-Enzym-Komplexes (K_m) durch graphische Darstellung nach LINEWEAVER und BURK (1934) (51). Hierbei sind die reziproken Werte der Re= aktionsgeschwindigkeit (v) als Funktion der reziproken

dUMP-Konzentrationen (s = Substratkonzentration) aufgetragen. Am Schnittpunkt der resultierenden Geraden mit der Ordinate läßt sich der reziproke Wert der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}), mit der Abszisse der negative Kehrwert der Dissoziationskonstanten (K_m) des dUMP-Enzymkomplexes ablesen. Die Michaeliskonstante (K_m) läßt sich auch nach folgender Formel (41,51) berechnen :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{v_{max}}$$

Für die oben angegebenen weißen Blutzellen wurde eine K_m von 4,95 x 10^{-5} M dUMP ermittelt.

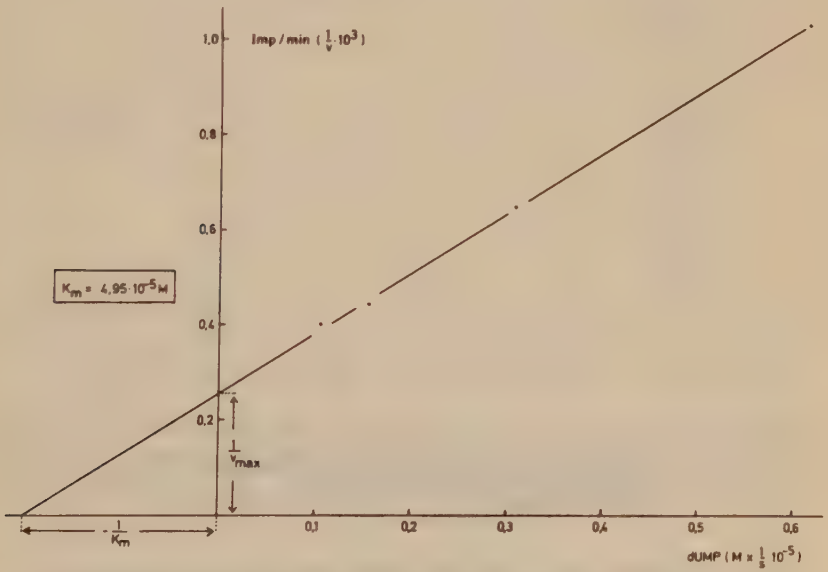

Abb. 6b): Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit = vmax (10^3 Imp./min.) und der Dissoziationskonstanten des Substrat-Enzymkomplexes (K_m) nach LINEWEAVER und BURK (51). (Pat. Br., akute Erythroleukämie. Substratkonzentration = s (10^{-5} M dUMP).)

3. Tetrahydrofolsäure (FH_4) -Konzentration :

Diesen enzymchemischen Untersuchungen lag ein Markpunktat (8,5 x 10^6 Zellen/Ansatz) eines Patienten mit akuter Leukämie zugrunde. Die bei verschiedenen FH_4-Konzentrationen, im übrigen aber unter konstanten Bedingungen gewonnenen Enzymaktivitätswerte sind in das Koordinatensystem der Abb. 7a) eingetragen.

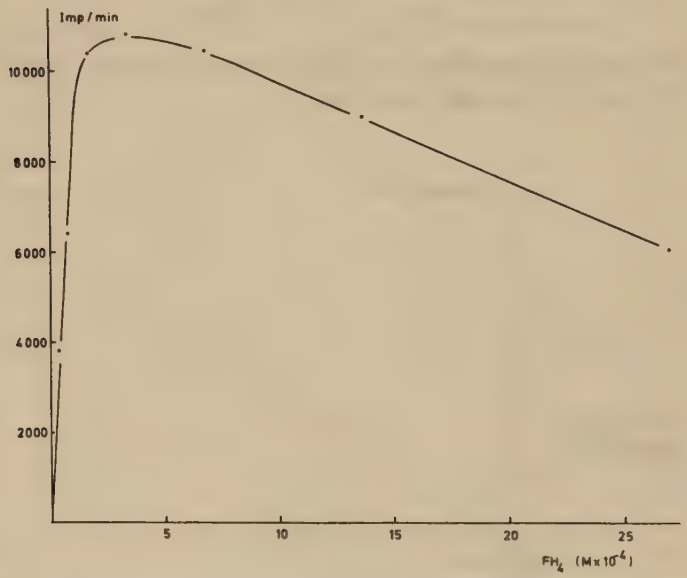

Abb.7a): Synthetaseaktivität in Abhängigkeit von der Tetra= hydrofolsäurekonzentration (FH_4). (Pat. Sch. , akute Leukämie)

Bemerkenswert ist, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei aufsteigenden FH_4-Konzentrationen bis zu einem Optimum an= steigt, dann aber allmählich wieder absinkt. Wie unentbehr= lich die Anwesenheit von FH_4 für die Thymidylat-Synthetase= reaktion ist, geht schon allein daraus hervor, daß in einem

Reaktionsgemisch ohne FH_4 lediglich eine vernachlässigbar geringe Impulsrate nachweisbar ist (siehe auch Tab.2). Abb.7b) zeigt die graphische Darstellung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der Michaeliskonstanten. Die auf Grund dieser Versuchsanordnung berechnete K_m für FH_4 beträgt $1{,}2 \times 10^{-4}$ M.

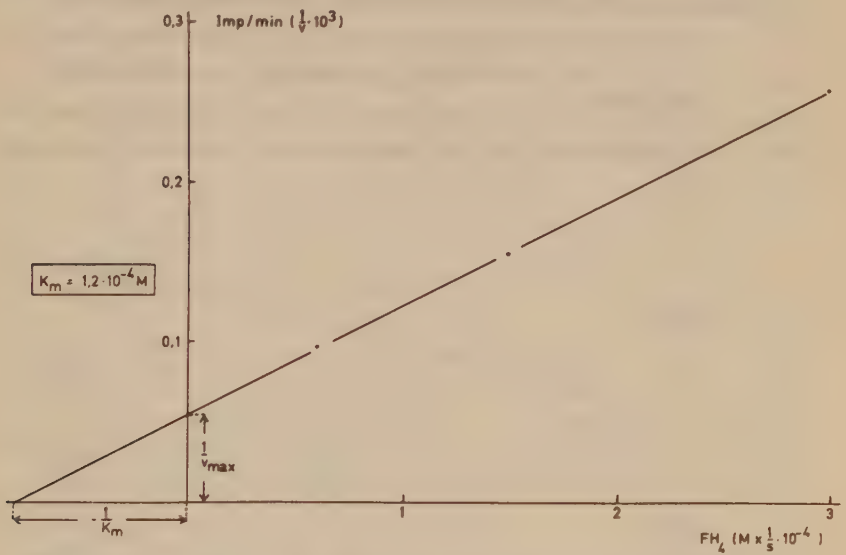

Abb.7b): Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit = v_{max} (10^3 Imp./min.) und der Dissoziationskonstanten des Substrat (FH_4)-Enzymkomplexes (K_m). (Pat. Sch., akute Leukämie . Substratkonzentrationen (10^{-4} M Tetrahydrofolsäure).)

4. Einfluß von $NADPH+H^+$:

Das Ziel dieser Untersuchungen bestand in der Beantwortung der Frage, ob und in welchem Ausmaß sich mit $NADPH+H^+$ innerhalb des FH_4-regenerierenden Systems eine Aktivitätssteigerung der Thymidylat-Synthetase erreichen läßt. Gemäß der

schematischen Abb.1 und den Gleichungen 1 und 2 (Einlei= tung) ist zur Aufrechterhaltung der Thymidylat-Synthetase= reaktion eine kontinuierliche Reduktion der bei der Sub= stratmethylierung entstehenden Dihydrofolsäure zu Tetra= hydrofolsäure erforderlich. Voraussetzung hierfür aller= dings ist neben der Thymidylat-Synthetase eine aktive Di= hydrofolsäure-Reductase in den Cytolysaten.
Versuche zur Bestimmung der optimalen NADPH+H^+-Konzentration erfolgten an den Knochenmarkzellen eines Patienten mit

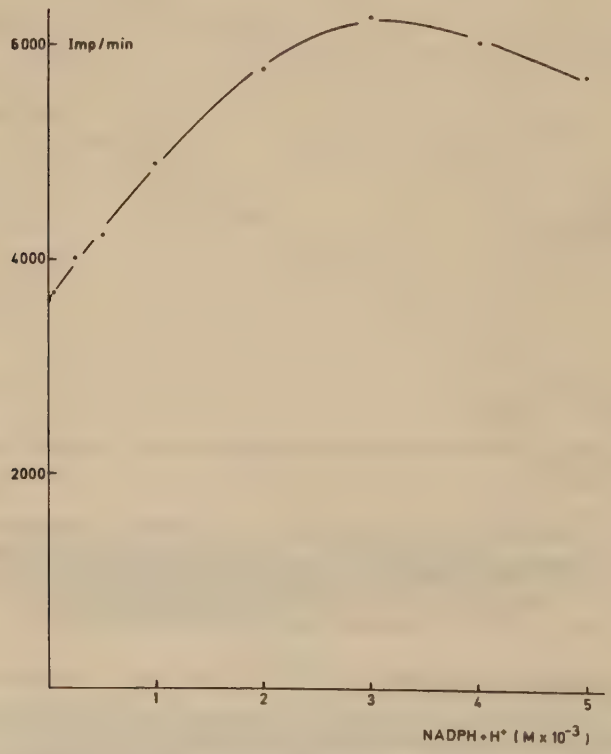

Abb.8: Einfluß von NADPH+H^+ auf die Thymidylat-Synthetase= reaktion. Bestimmung der optimalen NADPH+H^+-Kon= zentration. (Pat. Gu., chronische Myelose)

chronischer Myelose. Die Enzymaktivitäten wurden in Abhängigkeit von aufsteigenden $NADPH+H^+$-Konzentrationen (von 0,05-5 x 10^{-3} M) unter sonst konstanten Bedingungen bestimmt. Aus der Kurve in Abb.8 können die einzelnen Impulsraten abgelesen werden. Bei 3 x 10^{-3} M $NADPH+H^+$ weist die Kurve ein Maximum auf. Hier ist die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Versuchsbedingungen ohne $NADPH+H^+$ um 42 % höher.

5. Synthetaseaktivität in Abhängigkeit von der FH_4-Konzentration bei Zusatz von $NADPH+H^+$:

Um den Einfluß des Folat-Reductasesystems auf die Thymidylat-Synthese bei verschiedenen FH_4-Konzentrationen zu unter-

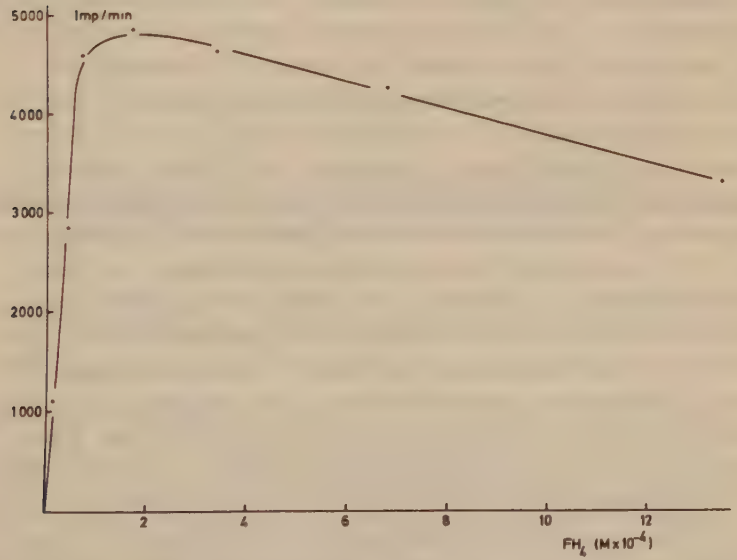

Abb.9: Thyminnucleotidsynthese in Abhängigkeit von der Tetrahydrofolsäurekonzentration (FH_4) bei Zusatz von $NADPH+H^+$. (Pat. Da., Zieve-Syndrom)

suchen, wurde den Inkubationsansätzen $NADPH+H^+$ zugesetzt (Abb.9). Die Konzentration von $NADPH+H^+$ betrug konstant 0,6 µMol/Ansatz, entsprechend dem in Abb.8 festgestellten Optimum bei 3×10^{-3} M. Während in Abb.7a) (ohne $NADPH+H^+$) der optimale dUMP-Umsatz noch bei einer FH_4-Konzentration von 67,5 mµMol/Ansatz ($3,4 \times 10^{-4}$ M) erfolgte, wurde dieser nach Zusatz von $NADPH+H^+$ bei einer FH_4-Konzentration von 33,75 mµMol/Ansatz ($1,7 \times 10^{-4}$ M) erreicht (Abb.9). Somit läßt sich unter Ausnutzung des FH_4-regenerierenden Systems die in die Inkubationsansätze einzusetzende Tetra= hydrofolsäuremenge um die Hälfte einsparen.

6. Formaldehydkonzentration :

Die Funktion und Bedeutung des Formaldehyds bei der Thymin= nucleotidsynthese kann aus den Reaktionsgleichungen 3 und 1 (Einleitung) abgeleitet werden. Die Ansätze enthielten Cytolysat (7×10^6 Zellen/Ansatz) von myeloischen Zellen des peripheren Blutes eines Patienten mit chronischer Myelose. Die Formaldehydkonzentrationen wurden in der in Abb.10 angegebenen Weise variiert. Bei $0,5 \times 10^{-4}$ M bzw. 1 µMol Formaldehyd/Ansatz reagierte das Enzym optimal. Höhere Formaldehydkonzentrationen bewirkten keine weitere Steigerung, vielmehr wieder eine Abnahme der Enzymaktivi= tät. In Formaldehyd-freien Reaktionsgemischen ist kein Substratumsatz zu erwarten. Daß unter dieser Bedingung trotzdem eine geringe Enzymaktivität gemessen wurde, ist vermutlich auf Restmengen von Serin (Serin-Aldolase !) in den Cytolysaten zurückzuführen. Die charakteristischen Kurvenverläufe, welche die Beziehung zwischen der dTMP-Synthese und der Formaldehydkonzentration (Abb.10) bzw. der FH_4-Konzentration (Abb.7a) und 9) ausdrücken, ähneln sich. Dies kann dadurch bedingt sein, daß sich FH_4 und Formaldehyd zuerst zu Methylen-FH_4, d.h. zu " aktiviertem Formaldehyd " verbinden müssen, bevor sie sich an der Thymidylat-Synthetasereaktion, deren Umsatzrate von dem

Ausmaß der Methylen-FH_4-Synthese mitbestimmt wird, beteiligen.

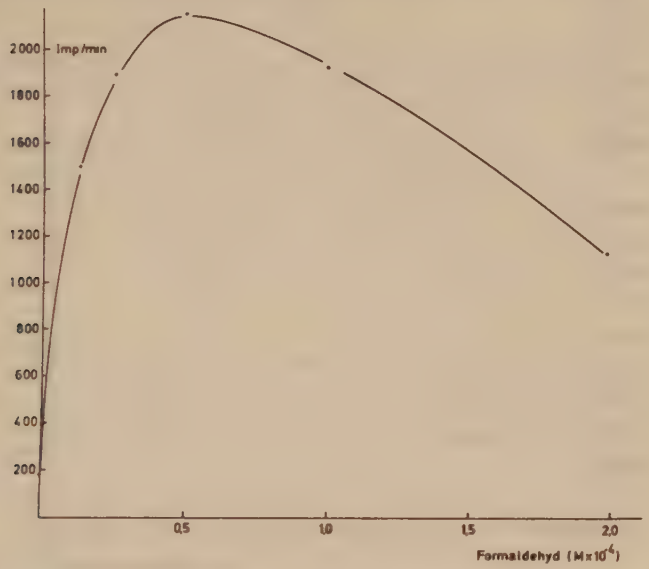

Abb.10: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Thymidylat-Synthetase von der Formaldehydkonzentration. (Pat. Sch., chronische Myelose)

II Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Inkubationszeit.

Die Ansätze enthielten Enzym aus Cytolysat von peripheren weißen Blutzellen eines Patienten mit Osteomyelofibrosklerose. Die spezifische Aktivität der Thymidylat-Synthetase in diesen Zellen betrug 42 mμMol/min./10^{10} Zellen. Die Reaktionsgemische wurden bis zu 4 1/2 Stunden inkubiert. Wie aus Abb.11 ersichtlich ist, verlief der Substratumsatz innerhalb einer Zeitspanne von 150-180 min. in linearer

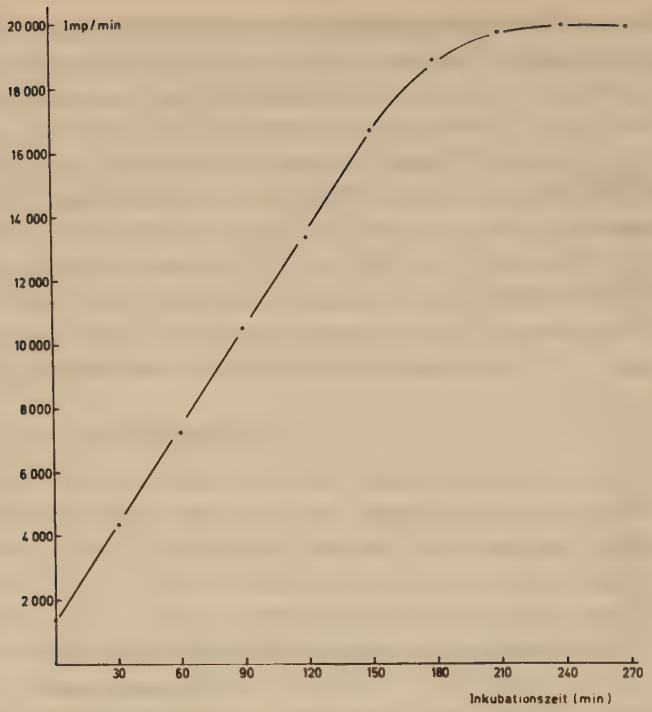

Abb.11: Abhängigkeit des dUMP-Umsatzes von der Inkubations= zeit. (Pat. Kr., Osteomyelofibrosklerose)

Abhängigkeit von der Zeit. Längere Inkubationszeiten er= gaben nur noch eine geringe Zunahme der Thymidylat-Synthe= se, die nach 4 Stunden völlig zum Stillstand kam.

III pH - Optimum

Als Enzymquelle dienten bei diesen Versuchen leukämische Knochenmarkzellen eines Patienten mit akuter Erythro= leukämie. Die spezifische Aktivität der Thymidylat-Syntheta=

se in diesen Zellen betrug 30 mµMol/min./10^{10} Zellen. Die Ansätze wurden mit zwei verschiedenen Pufferlösungen (0,05 M) bei variablen pH-Werten unter sonst konstanten Bedingungen inkubiert (Abb.12).

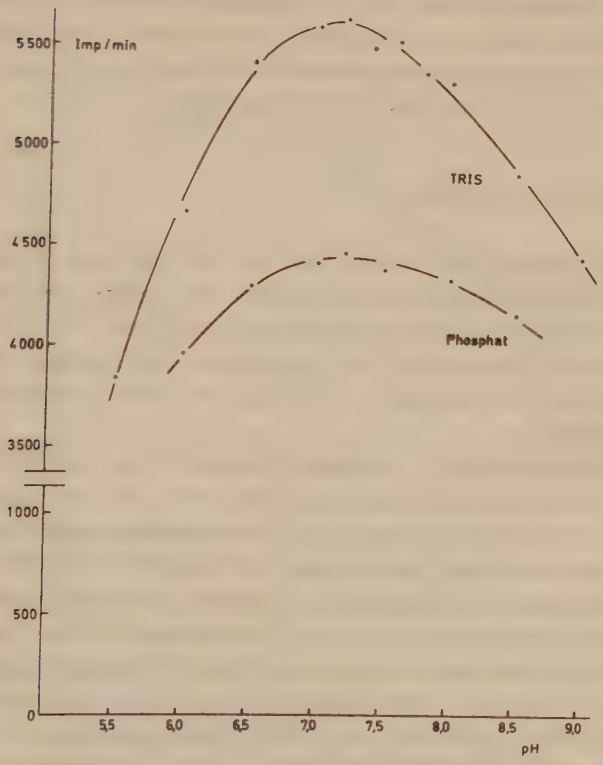

Abb.12: Thymidylat-Synthese in Abhängigkeit vom pH-Wert unter Verwendung von TRIS-Puffer bzw. Phosphat=puffer. (Pat. Br., akute Erythroleukämie)

a) TRIS-Puffer :

Die pH-Abhängigkeit der Thymidylat-Synthese in den unter=

suchten pathologischen Vorstufen bei Verwendung von TRIS-Puffer ist durch die obere Kurve in Abb.12 veranschaulicht. Es zeigt sich ein relativ breites pH-Optimum, dessen Maximum bei pH = 7,2 anzunehmen ist.

b) Phosphat-Puffer :
Der Verlauf der unteren pH-Kurve charakterisiert den Einfluß von Phosphatpuffer auf die Enzymaktivität. Auch hier läßt sich ein pH-Optimum um pH = 7,2 ablesen. Im Unterschied zu TRIS-Puffer jedoch sind die Impulsraten am Gipfelpunkt (pH = 7,2) um ca. 20 % niedriger.

IV Stabilität des Enzyms

Da die Enzymstabilität nicht nur von der Art des Enzyms, sondern vorallem auch davon abhängt, wie lange und unter welchen Bedingungen die Aufbewahrung erfolgt, gilt die Prüfung dieser örtlichen und zeitlichen Bedingungen als Voraussetzung für optimale Resultate bei den Aktivitätsbestimmungen.
Als Ausgangsaktivität (frisches Enzym) bzw. als Bezugswert von Aktivitätsbestimmungen, die sich in der Folgezeit einfach oder mehrfach wiederholt anschlossen, galt die unmittelbar nach der Isolierung und Cytolyse von Markzellen eines Patienten mit chronischer Myelose gemessene Thymidylat-Synthetaseaktivität. Der nicht verwendete Rest des untersuchten Cytolysats wurde in vier Portionen aufgeteilt : Die Teile A, B und C, von denen A mit 10 %iger Glucose versetzt worden war, wurden bei -15° C eingefroren aufbewahrt. Die Aufbewahrung von Teil D erfolgte in nicht eingefrorenem Zustand bei 2 - 4° C.

a) Mehrfach wiederholtes Einfrieren (-15°C) und Auftauen des Cytolysats während eines 14-tägigen Zeitraums :
Die Enzymaktivitäten der beiden als Teil A und B definierten Cytolysate wurden innerhalb von 14 Tagen 10 mal bestimmt.

Die vielen Versuche bedingten zwangsläufig ebenso häufiges Auftauen und Einfrieren. Nach zwei Wochen fiel die Enzym= aktivität im Glucose-freien Cytolysat um mehr als 50 %, im Glucose-haltigen sogar um weitere rund 10 %. Abb.13 zeigt den über eine Zeitspanne von zwei Wochen verfolgten, durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen verursachten Aktivitätsverlust.

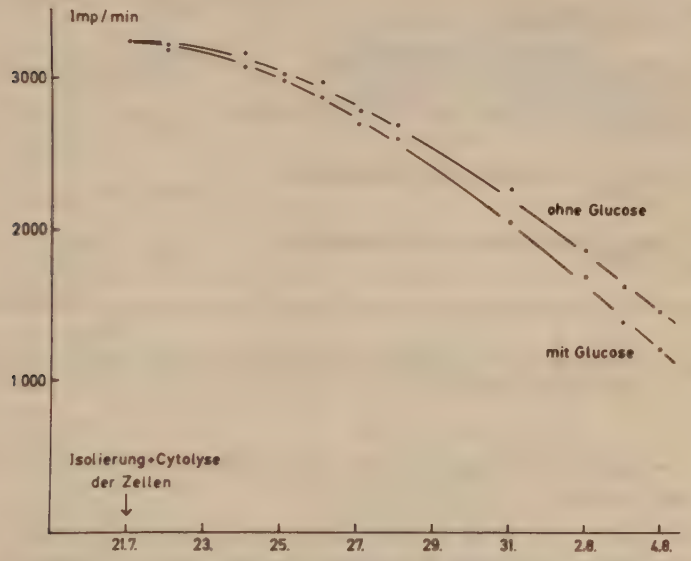

Abb.13: Stabilität der Thymidylat-Synthetase in unreifen myeloischen Zellen (mit und ohne Glucose). Mehr= fach wiederholtes Einfrieren (-15°C) und Auf= tauen des Cytolysats während eines 14-tägigen Zeit= raums. (Pat. Ei., chronische Myelose)

b) Einmaliges Auftauen des Cytolysats nach 14 Tagen :
In dem bei -15°C aufbewahrten Cytolysat (Teil C) wurde nach 14 Tagen die Enzymaktivität bestimmt. Die Aufbewahrung des Enzyms über 14 Tage ist bei nur einmaligem Auftauen mit

einem wesentlich geringeren Aktivitätsverlust verbunden als es bei den Cytolysaten (Teil A und B) der Fall war. Wie Tabelle 3 zeigt, beträgt dieser kaum 20 %.

	Aktivität	
	Imp./min.	%
Frisches Enzym (21.7.)	3250	100
a) Nach mehrfach wiederholtem Einfrieren (-15°C) und Auf= tauen während eines 14-tägigen Zeitraums.	1496	46
b) Nach 14-tägiger Aufbewahrung bei -15°C.	2662	82
c) Nach 14-tägiger Aufbewahrung bei 2-4°C.	1984	61

Tab.3: Stabilität der Thymidylat-Synthetase unter verschiede= nen Bedingungen.

c) 14-tägige Aufbewahrung des Cytolysats in nicht eingefrore= nem Zustand (2 - 4°C) :

Das bei 2 - 4°C zwei Wochen lang aufbewahrte Enzym (Teil D) erlitt einen Aktivitätsverlust von ca. 40 % (Tabelle 3). Der Verlust ist also im Vergleich zu dem bei -15°C aufbe= wahrten Cytolysat (Teil C) doppelt so hoch, jedoch geringer als die durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen erzeugte Aktivitätseinbuße.

T e i l B : Wirkung verschiedener Hemmfaktoren auf die Thymidylat-Synthese.

I 5-Fluor-Uracilderivate

5-Fluor-Uracil und seine Derivate können wie Uracil am Stoffwechsel teilnehmen, jedoch nicht in die Desoxyribo=

Molare Hemmstoff= konzentration	Prozentuale Hemmung der Thymidylat-Synthese		
	5-F-U	5-F-dUR	5-F-dUMP
1×10^{-9}			18
2×10^{-9}			27
4×10^{-9}			38
6×10^{-9}			41
1×10^{-8}			49
1×10^{-7}	3,5	4	56
5×10^{-7}	16,5	26	
1×10^{-6}	20	29	63
$2,5 \times 10^{-6}$	22	33,5	
5×10^{-6}	26,5	37,5	
1×10^{-5}	27,5	38	82,5
2×10^{-5}	30	44	
1×10^{-4}	37	48	96

Tab.4: Thymidylat-Synthesehemmung in Abhängigkeit von der Konzentration fluorierter Uracilderivate : 5-F-U (Pat. Scha., chronische Myelose), 5-F-dUR (Pat. Br., akute Erythroleukämie), 5-F-dUMP (Pat. Mas., akute Leukämie).

nukleinsäure eingebaut werden, da die Methylierung des 5-Fluor-desoxyuridinmonophosphats (5-F-dUMP) (entstanden aus 5-Fluor-Uracil → 5-Fluor-desoxyuridin → 5-F--dUMP) zum Thymidylat blockiert ist (58). Da 5-F-dUMP im Vergleich zu dUMP eine um ein Vielfaches höhere Affinität zur Thymidylat-Synthetase besitzt, bleibt dem physiologischen Substrat (dUMP) der Zugang zum Enzym versperrt, wodurch letzteres inaktiviert wird.

Als Inhibitoren wurden 5-F-Uracil (5-F-U), 5-F-desoxyuridin (5-F-dUR) und 5-F-dUMP in verschiedenen Konzentrationen den Inkubationsansätzen zugesetzt. Eine Hemmung des Substratumsatzes, die mit zunehmender Inhibitorkonzentration deutlicher wurde, konnte bei allen drei geprüften Substanzen festgestellt werden (Tabelle 4). Da in den untersuchten Zellen 5-F-U die schwächste, 5-F-dUMP die stärkste Hemmwirkung entfaltete, kann dieses Ergebnis wohl am besten durch die Relation : 5-F-U < 5-F-dUR < 5-F-dUMP charakterisiert werden.
Der Einfluß einer Präinkubation auf den Hemmeffekt wurde in einem zusätzlichen Versuch geprüft. Die Ansätze wurden ohne dUMP und FH_4 15 min. bei 37°C vorinkubiert. Die Hemmwirkung der eingesetzten Inhibitoren wurde dadurch nicht verbessert.

Dissoziationskonstanten des Substrat- und Hemmstoff-Enzymkomplexes (K_m und K_i) :

1. 5-F-dUR als Inhibitor

a) dUMP-Konzentration variabel :

Bei diesen Versuchen wurde Cytolysat von leukämischen Knochenmarkzellen eines Patienten mit chronischer Myelose in die Inkubationsansätze eingesetzt. Während die Enzymkonzentration und auch die 5-F-dUR-Konzentration konstant

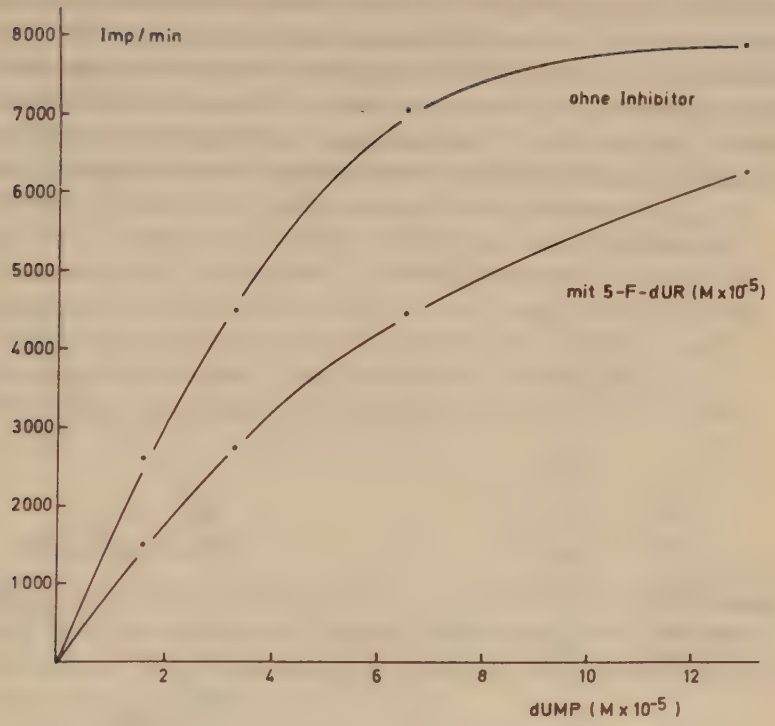

Abb.14: Hemmung der Thymidylat-Synthese durch 5-F-dUR in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (dUMP). (5-F-dUR konstant 1 x 10^{-5} M) (Pat. Gu., chronische Myelose)

blieben, wurden für das Substrat (dUMP) verschiedene Konzentrationen gewählt. Die Aktivitätsmessungen erfolgten sowohl mit als auch ohne Inhibitor in Abhängigkeit von aufsteigenden Substratkonzentrationen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen, das aus Abb.14 ersichtlich ist, wurde der Bestimmung der Michaeliskonstanten und Hemmkonstanten zugrunde gelegt.

Abb.15 zeigt die graphische Darstellung von K_m und K_i nach

LINEWEAVER und BURK (51). Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_m) des dUMP-Enzymkomplexes wurde in Verbindung mit Abb.6b) schon beschrieben. Die Bestimmung der Hemmkonstanten (K_i) soll an dieser Stelle kurz erläutert werden. Wie der Abb.15 zu entnehmen ist, schneidet die Gerade, die sich auf Grund der 5-F-dUR-Hemmung ergab, auch

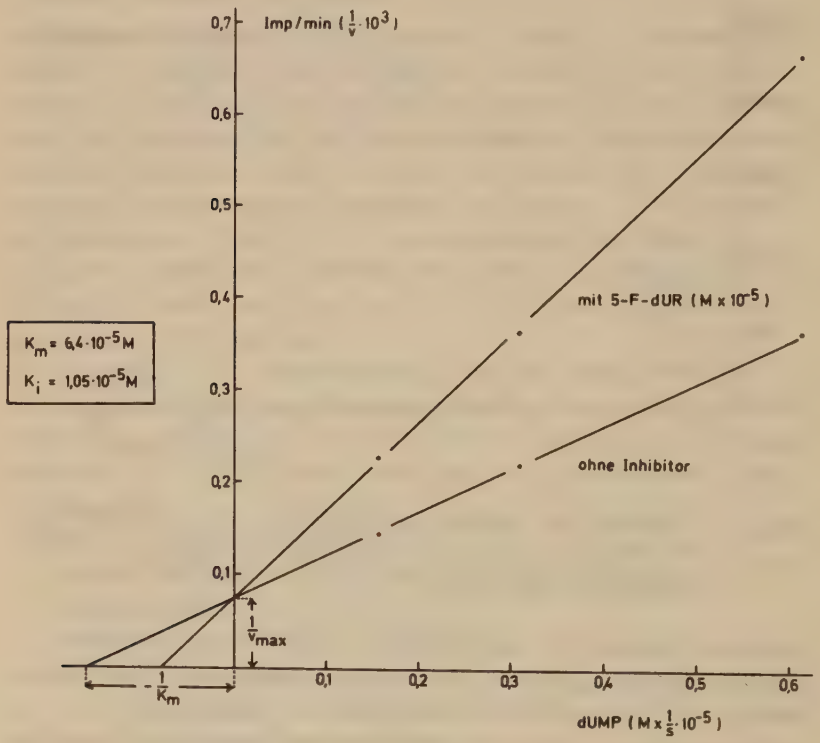

Abb.15: Kompetitive Hemmung der Thymidylat-Synthetase durch 5-F-dUR bei Variierung der dUMP-Konzentration. Bestimmung der Michaeliskonstanten (K_m) und der Dissoziationskonstanten des Inhibitor-Enzymkomplexes (K_i = Hemmkonstante) nach LINEWEAVER und BURK (51). (Pat. Gu., chronische Myelose. Reaktionsgeschwindigkeit = v (10^3 Imp./min.), Substratkonzentration = s (10^{-5} M dUMP).)

an zwei Stellen die Achsen des Koordinatensystems. Der Schnittpunkt mit der Abszisse zeigt eine scheinbare Vergrößerung der Michaeliskonstanten für dUMP an, während der Schnittpunkt mit der Ordinate beiden eingezeichneten Geraden gemeinsam ist.
Die beiden Kriterien, scheinbare Vergrößerung von K_m und identische maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max} in Abb.15), lassen die durch 5-F-dUR verursachte Hemmung als kompetitiv erscheinen. Dies beinhaltet die Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat, die durch hohe Substratkonzentrationen reversibel zugunsten des letzteren entschieden werden kann. Die graphische Darstellung der Hemmkonstanten findet auch ihren Ausdruck in der Formel (41,51) :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{Km}{v_{max}} \cdot \frac{1}{s} \cdot \left[1 + \frac{I}{K_i} \right] + \frac{1}{v_{max}}$$

Nach dieser wurde eine K_i von 1,05 x 10^{-5}M 5-F-dUR berechnet. Die Berechnung der Michaeliskonstanten für dUMP nach der bereits im Zusammenhang mit Abb.6b) angegebenen Formel ergab 6,4 x 10^{-5}M.

b) FH_4-Konzentration variabel :

Diese Untersuchung, die im Prinzip der vorhergehenden Versuchsanordnung entspricht, wurde mit aufsteigenden FH_4-Konzentrationen unter sonst konstanten Bedingungen durchgeführt (Inhibitorkonzentration : 10^{-5}M). Als Enzymquelle dienten unreife myeloische Zellen des peripheren Blutes eines Patienten mit akuter Leukämie. Das Ergebnis, das durch die Kurven in Abb.16 veranschaulicht ist, wurde in Abb.17 enzymkinetisch ausgewertet. Im Unterschied zu den Abbildungen 14 und 15 wurde auf der Abszisse FH_4 als Substrat aufgetragen. Die Hemmung unter diesen Bedingungen erweist sich als nicht kompetitiv, d.h. die maximale Reaktionsgeschwindigkeit - bezogen auf FH_4 als Substrat -

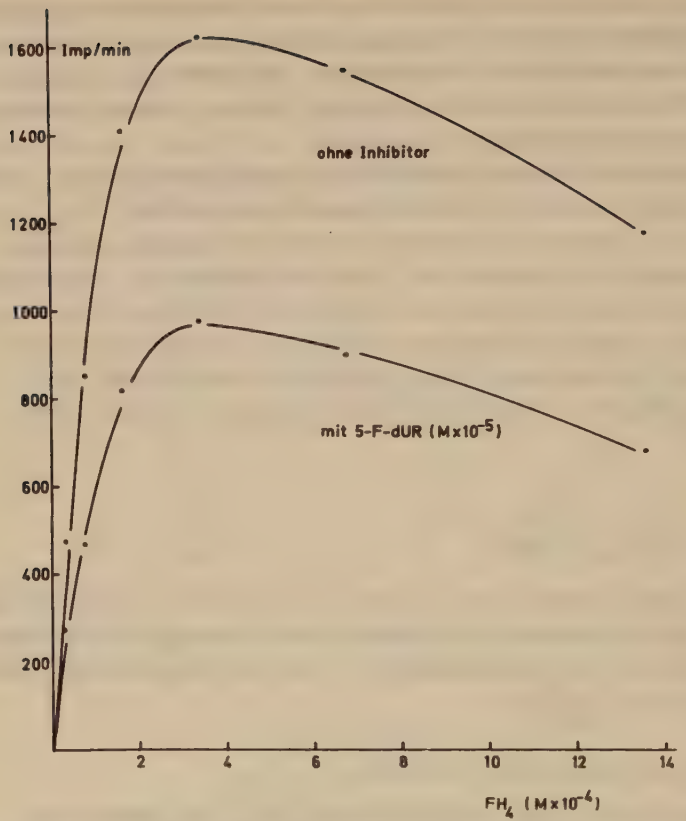

Abb.16: Hemmung der Thymidylat-Synthese durch 5-F-dUR in Abhängigkeit von der FH_4-Konzentration. (5-F-dUR konstant 1 x 10^{-5}M) (Pat. Ru., akute Leukämie)

ändert sich unter der Einwirkung von 5-F-dUR (zwei Schnitt= punkte auf der Ordinate). Der Hemmstoff und FH_4 kon= kurrieren also nicht um den gleichen Rezeptor am Enzym. Als K_m für FH_4 ließ sich 1,34 x 10^{-4}M ermitteln. Der nicht kompetitiven Hemmung des Enzyms in Bezug auf FH_4 ist die

Formel

$$\frac{1}{v_i} = \left[1 + \frac{I}{K_i}\right] \cdot \left[\frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{v_{max}}\right]$$

zugrunde gelegt. Die Hemmkonstante (K_i) betrug 1,43 x 10^{-5}M 5-F-dUR.

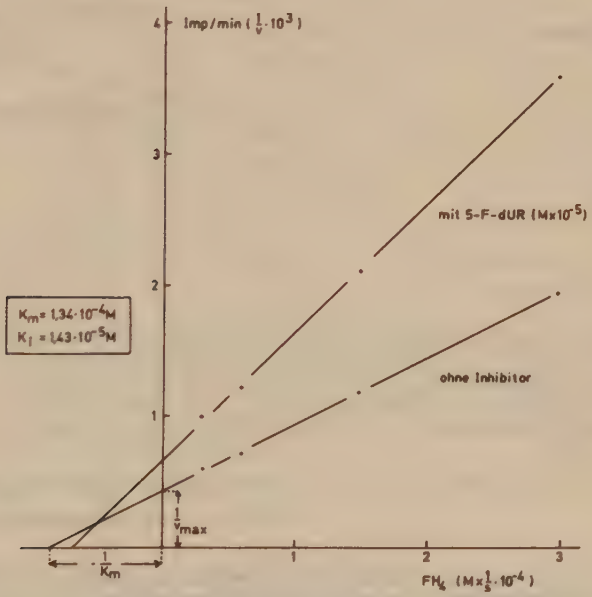

Abb.17: Nicht kompetitive Hemmung der Thymidylat-Synthetase durch 5-F-dUR bei Variierung der FH_4-Konzentration. Bestimmung der Michaelis- (K_m) und Hemmkonstanten (K_i). (Pat. Ru., akute Leukämie. Reaktionsgeschwindigkeit = v (10^3 Imp./min.), Substratkonzentration = s (10^{-4}M FH_4).)

2. 5-F-dUMP als Inhibitor

dUMP-Konzentration variabel :

5-F-dUMP, ein ausgesprochen starker Hemmstoff der Thymidy=

lat-Synthetase, wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, war in den Ansätzen mit einer Konzentration von 10^{-8}M enthalten. Unter sonst konstanten Bedingungen wurden die Enzymaktivitäten mit und ohne Inhibitor in Abhängigkeit von der dUMP-Konzentration bestimmt (Abb.18). Wie Abb.19 zeigt, hemmt

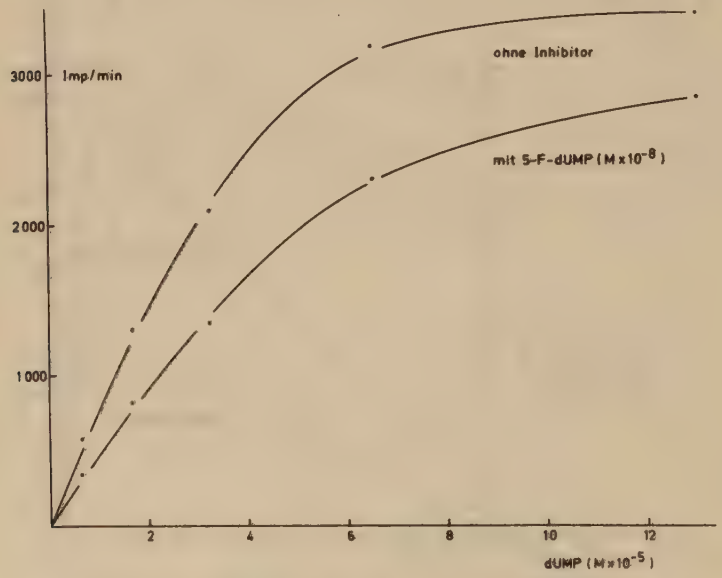

Abb.18: Hemmung der Thymidylat-Synthese durch 5-F-dUMP in Abhängigkeit von der dUMP-Konzentration. (5-F-dUMP konstant 1 x 10-8M) (Pat. Me., akute Leukämie)

5-F-dUMP das Enzym kompetitiv. Die Affinität des Inhibitors zum Enzym war über 3 000 mal stärker als die Affinität von dUMP zum Enzym, wie sich aus den Werten für K_m und K_i ergibt (K_m = 5,42 x 10^{-5}M dUMP, K_i = 1,48 x 10^{-8}M 5-F-dUMP). Das Verhältnis von K_m/K_i = 3,65 x 10^3 besagt, daß bei simultaner Inkubation von dUMP und 5-F-dUMP 1 Hemmstoffmolekül mit 3 650 Substratmolekülen erfolgreich um den

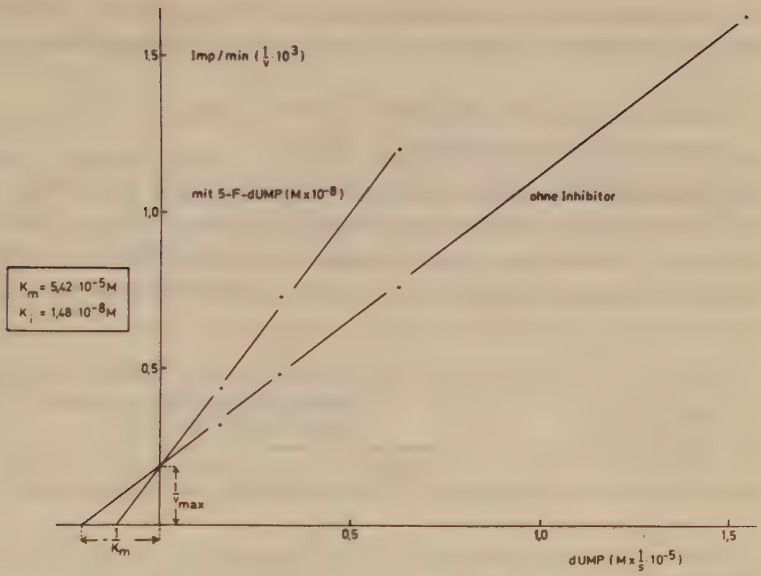

Abb.19: Kompetitive Hemmung der Thymidylat-Synthese durch 5-F-dUMP bei Variierung der dUMP-Konzentration. Bestimmung der Michaelis- (K_m) und Hemmkonstanten (K_i). (Pat. Me., akute Leukämie. Reaktionsgeschwindigkeit = v (10^3Imp./min.), Substratkonzentration = s (10^{-5}M dUMP).)

Rezeptor am Enzym konkurriert.

II Nicht fluorierte Pyrimidinderivate

1. Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) :

Die Frage, ob dTMP die Thymidylat-Synthetasereaktion, aus der die Verbindung selbst als Produkt hervorgeht, hemmt, wurde in Abhängigkeit von verschiedenen dTMP-Konzentrationen bei Konstanz der übrigen Ansatzkomponenten untersucht. Gemäß der Tabelle 5 führen aufsteigende dTMP-Konzentrationen zu einer zunehmend stärkeren Enzymhemmung.

Ein wirksamer Syntheseabfall (ca. 50 %) erfolgt jedoch erst in Gegenwart unphysiologisch großer Mengen dTMP.

2. Desoxythymidintriphosphat (dTTP) und Desoxycytidintriphosphat (dCTP) :

Die beiden Substanzen, die zusammen mit dGTP und dATP als unmittelbare Vorläufer der DNS gelten (Abb.1, Einleitung), waren als Inhibitoren der Thymidylat-Synthese fast wirkungslos. Selbst bei einer Konzentration von 10^{-4}M

Molare Hemmstoffkonzentration	Prozentuale Hemmung der Thymidylat-Synthese			
	dTMP	dTTP	dCTP	Cyt.-arab.
1×10^{-7}		0		2,5
5×10^{-7}		0,5		17
1×10^{-6}	3,5	1,5	4	20
$2,5 \times 10^{-6}$	9,5	3		25
5×10^{-6}	26	6,5	10	27
1×10^{-5}	30,5	8	12	30
2×10^{-5}		9		34
5×10^{-5}	38		17	
1×10^{-4}	46	15	22	39,5
5×10^{-4}	53			
1×10^{-3}	57,5		30	54

Tab.5: Hemmung der Thymidylat-Synthetase in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener nicht fluorierter Pyrimidinderivate. (Pat. Kr., Osteomyelofibrosklerose)

waren nur geringe Aktivitätsverluste des Enzyms festzu= stellen (Tab.5).

3. Cytosinarabinosid :

Diese Substanz nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als bei ihr nicht Desoxyribose, sondern Arabinose den Pentose= anteil stellt. Der Hemmeffekt des Inhibitors war im Ver= gleich zu dTMP bei einer Konzentration von 10^{-6}M 5 - 6 mal so stark. Die bei höheren Konzentrationen erreichte pro= zentuale Hemmung durch Cytosinarabinosid unterschied sich kaum noch gegenüber dTMP. So bewirkten bei 10^{-5}M beide Verbindungen einen Syntheseabfall um 30 % (Tabelle 5).

III Amethopterin (Methotrexat^{R})

Da Methotrexat zur Gruppe der Folsäureantagonisten gehört, kann diese Substanz die Thymidylat-Synthese nicht unmittel= bar, sondern nur über das FH_4-regenerierende System, als dessen Katalysator die FH_2-Reductase wirkt, beeinflussen (Abb.1, Gleichung 2, Einleitung). Die Anwesenheit von NADPH+H^{+}, einer nicht zu reichlich bemessenen FH_4-Konzen= tration und nicht zuletzt einer aktiven FH_2-Reductase in den Ansatzgemischen bewirkt einerseits eine Aktivitäts= steigerung der Thymidylat-Synthetase (Abb.8) und ist andererseits zugleich Voraussetzung für eine wirksame Hem= mung durch Methotrexat.
Die Prüfung des Einflußes von Methotrexat auf die Thymidy= lat-Synthese erfolgte sowohl mit als auch ohne NADPH+H^{+}- Zusatz. Wenn Methotrexat seine Hemmwirkung tatsächlich über die FH_2-Reductasereaktion entfaltet, dann dürfte von dieser Substanz in einem NADPH+H^{+}-freien Ansatz keine wesentliche Hemmung ausgehen. Die Bestätigung hierfür konnte erbracht werden (Tabelle 6). Andererseits müßten aber die Inkubationsansätze, die NADPH+H^{+} und eine aktive

Molare Methotrexat= konzentration	S.A.	% Hemmung	S.A.	% Hemmung
	ohne $NADPH+H^+$		mit $NADPH+H^+$	
0	12,3	-	23,25	-
1×10^{-7}			21,0	10,0
5×10^{-7}			15,3	34,0
1×10^{-6}	12,1	2,0	13,7	41,0
5×10^{-6}			12,9	44,5
1×10^{-5}	11,85	3,5	12,4	47,0
5×10^{-5}			11,8	49,0
1×10^{-4}			11,0	52,5

Tab.6: Thymidylat-Synthetasehemmung in Abhängigkeit von der Methotrexatkonzentration mit und ohne Zusatz von $NADPH+H^+$. (33,75 mμMol FH_4/Ansatz bzw. $1,7 \times 10^{-4}$M; 0,6 μMol $NADPH+H^+$/Ansatz bzw. 3×10^{-3}M. S.A. = mμMol Substratumsatz/min./10^{10} Zellen. Pat. Da., Zieve-Syndrom)

FH_2-Reductase bei begrenzter FH_4-Konzentration enthalten, eine Einschränkung ihrer Substratumsätze erfahren. Um dies zu zeigen, wurden Reaktionsgemische, welche die angegebenen Bedingungen erfüllten, unter der Einwirkung aufsteigender Methotrexatkonzentrationen inkubiert. Wie die Ergebnisse in Tabelle 6 zeigen, gehen aufsteigende Methotrexatkonzentrationen mit einem zunehmenden Aktivitätsverlust der Thymidylat-Synthetase einher.

In Abb.20 ist der wichtige Zusammenhang zwischen der Thymidylat-Synthetasereaktion und dem Folatreductasesystem graphisch dargestellt. Zur Inkubation gelangten Ansätze, die einmal FH_4, zum anderen nur FH_2 enthielten. Jeder der beiden Ansatztypen wurde mit und ohne $NADPH+H^+$ auf den Hemm=

effekt von Methotrexat untersucht. Das Enzym stammte aus dem Knochenmark eines Patienten mit perniziöser Anämie. Die eingesetzten Mengen FH_2 bzw. $NADPH+H^+$ betrugen konstant 0,1 µMol/Ansatz bzw. 0,25 µMol/Ansatz. Die Konzentration von Methotrexat war konstant 10^{-6}M.
Auch bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, daß

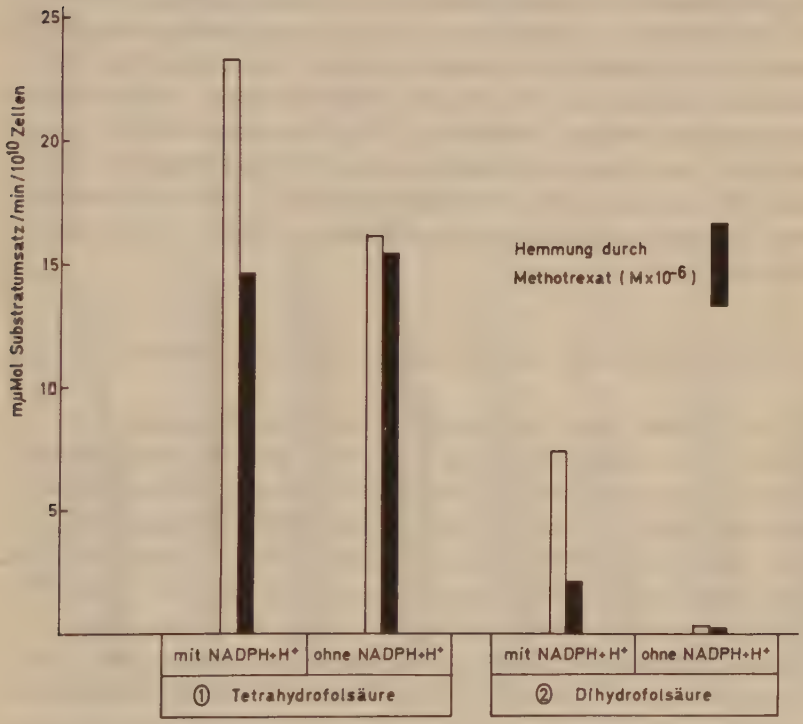

Abb.20: Hemmung des dUMP-Umsatzes durch Methotrexat (konstant 10^{-6}M) unter besonderer Berücksichtigung des Einflußes von $NADPH+H^+$.
① In Gegenwart von Tetrahydrofolsäure
② In Gegenwart von Dihydrofolsäure
(Pat. Ze., perniziöse Anämie)

$NADPH+H^+$ neben der Thymidylat-Synthetaseaktivierung die Wirksamkeit von Methotrexat entscheidend beeinflußt. Interessant waren die Ergebnisse bei den Ansatzvarianten, die FH_2 in Gegenwart von $NADPH+H^+$, aber kein FH_4 von vornherein besaßen (Abb.20). Hier kam die Hemmung besonders stark zum Ausdruck, da die Thymidylat-Synthetasereaktion vollständig auf die durch die FH_2-Reductase katalysierte FH_4-Synthese, die aber durch Methotrexat blockiert wurde, angewiesen war. In Ansätzen, die FH_2 ohne Zusatz von $NADPH+H^+$ enthielten, konnte kein nennenswerter Substratumsatz nachgewiesen werden. Da die für die dTMP-Synthese unter diesen Bedingungen absolut notwendige FH_2-Reductasereaktion nicht abläuft, kann von Methotrexat keine Wirkung erwartet werden. Bei der geringen Ausgangsaktivität (ohne Methotrexat) wäre jedoch der Nachweis einer Hemmung ohnehin kaum möglich gewesen.

IV Einfluß weiterer cytostatisch wirkender Substanzen.

Zur Verfügung stand bei diesen Versuchen Cytolysat von myeloischen Vorstufen eines Patienten mit chronischer Myelose. Die Ansätze wurden zusammen mit dem jeweils eingesetzten Cytostaticum vor Beginn der dTMP-Synthese, d.h. vor Zugabe von dUMP und FH_4, 15 min. bei 37^oC vorinkubiert. Die Hemmstoffkonzentrationen betrugen $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ und $10^{-3}M$, von denen letztere beide in vivo nicht erreicht werden dürften. Bei Betrachtung der Abb.21 fällt auf, daß fluoriertes Prednisolon (Dexamethason) sogar in relativ hoher Konzentration ($10^{-3}M$) einen im Gegensatz zu reinem Prednisolon geringen Hemmeffekt hervorruft. Gleichermaßen gering war auch die durch Cyclophosphamid (Endoxan) bewirkte Aktivitätsabnahme der Thymidylat-Synthetase, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß es sich bei dieser Verbindung um eine inaktive, unwirksame Form handelt,

deren Aktivierung im Organismus (Lebermikrosomen (19)) zwar erfolgen kann, in den Inkubationsansätzen aber ausbleibt. Die übrigen Präparate, insbesondere Vincristinsulfat (Oncovin) und Vinblastinsulfat (Velbe) sowie Trisäthyleniminobenzochinon (Trenimon) und Triäthylenmelamin (TEM) hemmten wesentlich stärker. Verglichen aber mit 5-F-dUMP war die Wirkung dieser Substanzen selbst bei 10^{-3}M gering, sodaß ihr Hemmechanismus nicht sicher beurteilt werden kann.

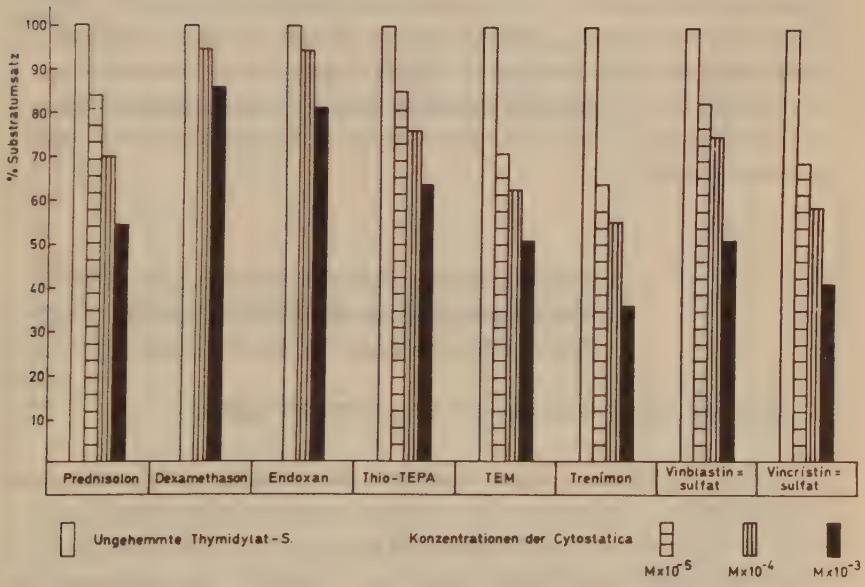

Abb.21: Hemmung der Thymidylat-Synthetase durch verschiedene Cytostatica. (Konzentrationen der Hemmsubstanzen : 10^{-3}M, 10-4M und 10^{-5}M. Pat. Ze., perniziöse Anämie)

V Wirkung von Normalserum und von Cytolysat ausgereifter Leukocyten.

Diese Untersuchungen gingen von der Frage aus, ob Faktoren oder Enzyme im normalen Serum oder in normalen Leukocyten existieren, welche die Thymidylat-Synthese in pathologisch veränderten weißen Blutzellen in irgendeiner Weise zu beeinflussen vermögen. Zu diesem Zweck wurden Cytolysate von leukämischen Markzellen (etwa 5-6 x 10^6 Zellen/Reaktionsgemisch) zusammen mit Cytolysat von normalen Leukocyten (etwa 4-5 x 10^6 Zellen / Ansatz) oder zusammen mit Normalserum (0,02 ml/Ansatz) bei im übrigen konstanten Bedingungen inkubiert. Die pathologischen Zellen stammten von zwei Patienten, von denen einer eine chronische, der andere eine akute Leukämie hatte. Weder durch Cytolysat von ausgereiften Leukocyten noch durch Serum konnte die Aktivität der Thymidylat-Synthetase in den untersuchten unreifen Zellen bei chronischer oder akuter Leukämie verändert werden.

T e i l C : Thymidylat-Synthetaseaktivität in weißen Blutzellen und im Knochenmark unter normalen und pathologischen Bedingungen.

I Systematische Enzymaktivitätsbestimmungen

Die spezifischen Substratumsätze der Thymidylat-Synthetase in normalen, leukämischen und andersartig pathologischen weißen Blut- und Knochenmarkzellen sind in den Tabellen 8 - 13 zusammengestellt. Tabelle 7 enthält die dazugehörigen Mittelwerte ($\bar{x}$) mit Standardabweichungen ($\pm$ s), synoptisch mit den in der Literatur (15,77,79) angegebenen Werten für die FH_2-Reductase und Thymidin-Kinase. Im Vergleich zu den Aktivitäten anderer Enzyme des Folsäure-

Untersuchte Zellen	N	Thymidylat-Synthet.	N	Thymidin-Kinase	FH_2-Reductase
		$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$	
Normale Leukocyten (peripher)	9	1,3 ± o,5	5	< 1	keine Aktivität nachweisbar
Normale Markzellen	12	16,1 ± 4,5	12	10 ± 5	281 ± 87
Akute Leukämien					
periphere Zellen	11	6,2 ± 3,3	24	10 ± 7,5	184 ± 87
Markzellen	8	21,0 ± 7,1	11	41 ± 25	269 ± 111
Chron. Myelosen					
periphere Zellen	8	7,4 ± 2,9	12	22 ± 15	269 ± 100
Markzellen	6	18,1 ± 6,7	-	-	-
Chron.Lymphadenosen					
periphere Zellen	6	1,1 ± 0,3	4	< 1	keine Aktivität nachweisbar
Perniziöse Anämien					
Markzellen	4	28,6 ± 8,0	6	126 ± 42	615 ± 80

Tab.7: Durchschnittliche Thymidylat-Synthetaseaktivität in weißen Blutzellen und im Knochenmark zusammen mit den in der Literatur (15,77,79) angegebenen Werten für die Thymidin-Kinase und FH_2-Reductase. (Spezif. Enzymaktivität = mµMol Substratumsatz/min./10^{10} Zellen.)

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung berechnet aus : $\pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$

stoffwechsels sind die Thymidylat-Synthetaseaktivitäten erheblich niedriger. So betrugen die in normalen Knochenmarkzellen bestimmten Substratumsätze bei der FH_2-Reductase (77,79) durchschnittlich etwa das 15-20fache, bei der Methyl-FH_4-Dehydrogenase (79) im Mittel das 15-30fache und bei der FH_4-Formylase (79) sogar bis zum 50fachen der bei der Thymidylat-Synthetase ermittelten Substratumsätze. Die aus den Tabellen ersichtlichen Enzymaktivitäten entsprechen größenordnungsmäßig noch am ehesten den von Wilmanns (77) gefundenen Thymidin-Kinaseaktivitäten in weißen Blutzellen.

Pat.	Diagnose	Thymidylat-Synthetaseaktivität
Br.	Chron.Glom.nephritis	0,71 (0,08)
Kl.	Chron. Proctitis	0,94 (0,09)
Ro.	Bronchus-Carcinom	0,93 (0,05)
St.	Myocarditis	1,2 (0,12)
Th.	Carcinoid	2,1 (0,23)
Rü.	Urämie	0,75 (0,05)
Ri.	Herzinsuffizienz	1,74 (0,15)
Ma.	Ulcus ventriculi	2,13 (0,2)
Schö.	Coxitis	1,6 (0,13)

Tab.8: Thymidylat-Synthetaseaktivitäten in Leukocyten des Blutes. (mµMol Substratumsatz/min./10^{10} Zellen bzw. mµMol Substratumsatz/h/mg Protein = Zahlen in Klammern.) Bei allen Patienten über 70% Granulocyten im Differentialblutbild.

Wie die Tabellen 7 - 9 zeigen, waren in reifen Leukocyten und in peripheren Lymphocyten bei chronischen Lymphadenosen

nur minimale Thymidylat-Synthetaseaktivitäten nachweisbar. Die Differentialblutbilder der betreffenden Patienten wiesen über 70% Granulocyten bzw. Lymphocyten auf.

Pat.	Thymidylat-Synthetaseaktivität in	
	peripheren Zellen	Markzellen
Hö.	1,26 (0,21)	6,47 (0,64)
Th.	0,99	13,o (1,0)
Wa.	0,42 (0,05)	
Mü.	1,34 (0,25)	
Zi.	1,5 (0,2)	
Gr.	0,93 (0,24)	

Tab.9: Thymidylat-Synthetaseaktivitäten in weißen Blutzellen bei chron. Lymphadenosen. (Aktivitätsbezeichnung s.Tab.7) Bei allen Patienten über 70% Lymphocyten im Differentialblutbild.

Die Durchschnitts- und auch Maximalwerte der in Paraleukoblasten des peripheren Blutes bei akuten Leukämien ermittelten Enzymaktivitäten stimmten fast mit den in peripheren myeloischen Vorstufen bei chronischen Myelosen erhaltenen Werten überein (Tabelle 7, Abb.22). Die Aktivitätsbestimmungen in den Markzellen bei den genannten Leukämien ergaben ebenfalls etwa gleich große Maximalwerte (Abb.22), wenn auch bei akuten Leukämien im Durchschnitt eine etwas höhere Thymidylat-Synthetaseaktivität gefunden wurde (Tabelle 7). Innerhalb der akuten wie auch der chronischen Leukämien gab es deutliche Unterschiede zwischen peripheren Zellen und Markzellen und zwar insofern,als die spezifische Enzymaktivität in letzteren stets deutlich höher

war als in den weißen Blutzellen. Dies ließ sich anhand von Paralleluntersuchungen, bei denen die Enzymaktivitäten sowohl peripher als auch im Knochenmark bestimmt wurden, bei 6 Patienten mit akuter Leukämie und bei 5 Patienten mit chronischer Myelose zeigen (Tabelle 10 und 11). Die Thymidylat-Synthetaseaktivität in den Markzellen bei chronischen Myelosen ist im Durchschnitt mehr als doppelt,

Pat.	Thymidylat-Synthetase= aktivität in		prozent.Anteil der Paraleukoblasten	
	periph.Zellen	Markzellen	peripher	Mark
Schr.	12,2 (0,7)	27,12 (1,8)	93	99
Ro.	2,38 (0,1)	12,86 (1,2)	77	90
Mas.	2,6 (0,48)	16,9 (1,3)	13	78
Me.	2,87 (0,25)	12,2 (1,16)	75	95
Be.	6,0 (0,9)	22,4 (3,6)	72	95
Re.	9,75 (0,76)	29,75 (1,8)	72	76
Ki.		17,6 (1,38)		73
Mau.		29,25 (1,6)		98
La.	4,2 (0,7)		98	
Lo.	10,2 (1,2)		61	
Br.	5,45 (0,6)		21	
Ep.	6,9 (0,38)		20	
Bu.	5,84 (0,8)		90	

Tab.10: Thymidylat-Synthetase in weißen Blutzellen und im Knochenmark bei akuten Leukämien. (Aktivitäts= bezeichnung s. Tabelle 7)

bei akuten Leukämien durchschnittlich mehr als dreifach so hoch wie in den Zellen des Blutes (Tabelle 7, Abb.22). Wie den Tabellen 10 und 11 zu entnehmen ist, können die Aktivitätsunterschiede im Einzelfall noch erheblich größer sein.

Pat.	Thymidylat-Synthetase=aktivität in		Prozent.Anteil mye=loischer Vorstufen	
	weißen Blut=zellen	Markzellen	peripher	Mark
Ei.	5,18 (0,46)	15,53 (1,33)	25	37
Kr.	3,6 (0,3)	11,4 (1,5)	8	33
Ju.	7,45 (0,6)	30,0 (1,54)	87	98
Po.	9,2 (0,88)	19,6 (1,44)	24	50
Ho.	12,05 (0,54)	19,5 (0,9)	28	47
Fl.		12,8 (0,3)		31
Sa.	10,75 (1,1)		12	
Scha.	5,12 (0,8)		85	
Ko.	6,03 (0,7)		49	

Tab.11: Thymidylat-Synthetase in weißen Blutzellen und im Knochenmark bei chronischen Myelosen. (Aktivitäts=bezeichnung s.Tabelle 7 ; weiße Vorstufen = Myelo=blasten, Promyelocyten, Myelocyten)

Um die enzymchemischen Befunde in pathologischen unreifen Zellen richtig bewerten zu können, wurden auch in normalen Leukocytenvorstufen Aktivitätsbestimmungen durchgeführt (Tabelle 12). Obwohl die durchschnittliche Aktivität des Enzyms (Tabelle 7) in normalen Vorstufen geringer ist

als in leukämischen Markzellen, sind die Unterschiede doch nicht so erheblich, um auf Grund dieser diagnostische Rück= schlüsse ziehen zu können. Dies ist aus Abb.22 ersichtlich. In nicht leukämischen, hyperregenerierenden Vorstufen können fast ebenso hohe Maximalaktivitäten gefunden werden wie in leukämischen Markzellen.

Pat.	Diagnose	Prozent.Anteil myeloischer Vorstufen	Thymidylat-Synthetase= aktivität
Za.	Amyloidose	22	11,13 (0,85)
Ko.	Hepatitis	18	14,3 (0,46)
Da.	Zieve-Syndrom	49	23,25 (1,2)
Ke.	Lup.eryth.diss.	25	14,95 (1,0)
Ba.	Magen-Darmblut.	38	16,2 (1,24)
Ha.	Lebercirrhose	24	11,7 (0,95)
Mey.	Amyloidose	17	12,9 (0,64)
Ku.	Colon-Carcinom	36	25,0 (1,4)
Fr.	Rectum-Carcinom	47	18,8 (0,64)
Hi.	Lerbercirrhose	40	18,5 (1,1)
We.	M.Hodgkin	10	11,0 (0,7)
Met.	Hepatitis	18	15,7 (1,0)

Tab.12: Thymidylat-Synthetase in nicht leukämischen Knochen= markzellen. (Aktivitätsbezeichnung s. Tabelle 7 ; weiße Vorstufen = Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten)

Die höchsten Aktivitäten des Enzyms in leukämischen Knochen=

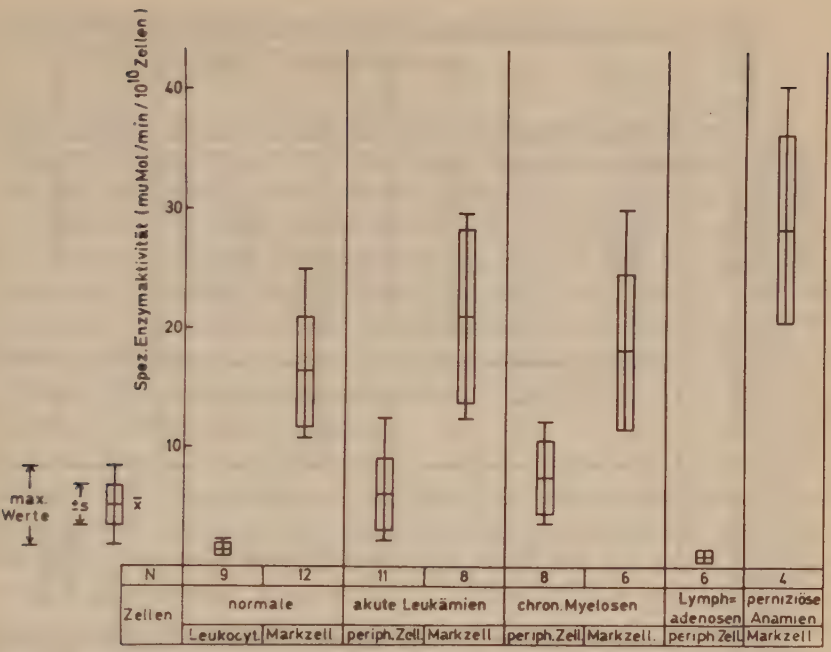

Abb.22: Thymidylat-Synthetaseaktivitäten in normalen und pathologischen weißen Blut- bzw. Knochenmarkzellen.

markzellen wurden bei Patienten mit akuter Erythroleukämie festgestellt (Tabelle 13). Ebenfalls hohe Umsatzraten ergaben die Untersuchungen an Markzellen bei perniziösen Anämien. Bei Patient Vo. (Tabelle 13) war die Thymidy= lat-Synthetaseaktivität sogar höher als die maximalen Aktivitäten bei Leukämien. Auch in den peripheren weißen Blutzellen einer Patientin mit Osteomyelofibrosklerose (Pat. Kr., Tab.13) wurde ein im Vergleich zu leukämischen Zellen des Blutes um ein Vielfaches höherer spezifischer Substratumsatz gefunden, der zugleich der höchste aller untersuchten Fälle war.

Pat.	Diagnose	R/W	% Megalo= blasten	% myeloische Vorstufen		Thymidylat-Synthetase= aktivität	
				p.	M.	p.	M.
Br.	Akute Erythro= leukämie	0,92			34		30,1 (2,36)
Hi.	Akute Erythro= leukämie	0,9			30		31,2 (2,24)
Vo.	Perniz.Anämie	0,48	57		32		40,6 (1,8)
Schr.	Perniz.Anämie	0,14	0		33		24,7 (2,2)
St.	Perniz.Anämie	0,6	38		65		25,5 (1,7)
Ze.	Perniz.Anämie	1,73	52		46		23,5 (1,6)
Kr.	Osteomyelo= fibrosklerose			87		42,25 (3,1)	

Tab.13: Thymidylat-Synthetase in Knochenmarkzellen bei akuten Erythroleukämien und bei perniziösen Anämien sowie in peripheren weißen Blutzellen bei Osteomyelofibro= sklerose. (Aktivitätsbezeichnung s.Tabelle 7 ; R/W = Verhältnis rote/weiße Vorstufen ; p.= peripher , M.= Mark)

II Korrelation zwischen biochemischen Veränderungen und morphologischen Eigenschaften.

Von besonderer Bedeutung ist die Frage nach dem Zusammenhang zwischen den ermittelten spezifischen Enzymaktivitäten und dem prozentualen Anteil myeloischer Vorstufen (Myeloblasten bzw. Paraleukoblasten, Promyelocyten und Myelocyten). Durch statistische Berechnung der Korrelationskoeffizienten konnte diese Frage geklärt werden. Tabellen, aus denen diese Berechnungen ersichtlich sind, sowie Abbildungen, welche die Korrelation graphisch darstellen, sind im Anhang aufgeführt (Tab.Ia und IIa, III-V und Abb. Ib und IIb).
Wie aus den Tabellen Ia und IIa ersichtlich ist, besteht für normale Knochenmarkzellen sowie für Markzellen bei chronischen Myelosen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Aktivität der Thymidylat-Synthetase und dem prozentualen Anteil myeloischer Vorstufen. In beiden Fällen konnten die errechneten Korrelationskoeffizienten dem Signifikanzniveau von 1% zugeordnet bzw. mit den tabellarisch entnommenen Zufallshöchstwerten bei 1% Überschreitungswahrscheinlichkeit verglichen werden. Diese korrelative Abhängigkeit kommt auch in den beiden Abbildungen Ib und IIb zum Ausdruck. Anders hingegen verhält es sich mit den Vorstufen im peripheren Blut bei chronischen Myelosen und auch mit den im Blut und im Knochenmark anzutreffenden Paraleukoblasten bei akuten Leukämien (Tab.III, IV und V im Anhang). In diesen Fällen liegen die Korrelationskoeffizienten beträchtlich unter den entsprechenden Zufallshöchstwerten bei 5% Überschreitungswahrscheinlichkeit und weichen somit nicht signifikant von Null ab.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die in vorhergehenden Abschnitten bereits berechneten Michaeliskonstanten (K_m) der Thymidylat-Synthetase für dUMP und FH_4. Die für dUMP berechneten Dissoziationskonstanten bei verschiedenen

Pat.	Diagnose	S.A.	K_m	
			dUMP	d,l-FH_4
Me.	Akute Leukämie	(M) 11,9	$5{,}42 \times 10^{-5}$M	
Br.	Akute Erythro=leukämie	(M) 7,8	$4{,}95 \times 10^{-5}$M	
Gu.	Chron.Myelose	(M) 20,6	$6{,}4 \times 10^{-5}$M	
Schr.	Akute Leukämie	(M) 27,1		$1{,}2 \times 10^{-4}$M
Ru.	Akute Leukämie	(p) 4,9		$1{,}34 \times 10^{-4}$M

Tab.14: Spezifische Aktivitäten (S.A.) und Michaeliskonstanten (K_m) für dUMP und FH_4 bei der Thymidylat-Synthetase in leukämischen Zellen. (Spezifische Aktivität = mµMol Substratumsatz/min./10^{10}Zellen. (M) = Mark, (p) = peripheres Blut)

Patienten unterscheiden sich voneinander nur wenig. Dasselbe gilt für die auf FH_4 bezogenen Konstanten. Zur Halbsättigung des Enzyms sind von FH_4 etwa doppelt so hohe Konzentrationen erforderlich wie von dUMP. Weiterhin fällt auf, daß trotz etwa gleichbleibender Affinität der Substrate zum Enzym (K_m) der Substratumsatz (S.A.) erheblich variabel sein kann.

T e i l D : Therapeutische Beeinflussung der Thymidylat-Synthetase.

Eine cytostatische Therapie, gleichgültig ob diese bei Blutkrankheiten wie Leukämien oder bei Erkrankungen in anderen Organsystemen, beispielsweise Carcinomen, angewandt wird, führt gewöhnlich zu Veränderungen des Blutes bzw. des

blutbildenden Gewebes, da letzteres chemotherapeutisch wirksamen Substanzen gegenüber besonders empfindlich ist. Daher können wiederholt erhobene biochemische Befunde, kombiniert mit solchen klinischer und hämatologischer Art, einerseits die therapeutische Wirkung, andererseits aber auch toxische Nebenwirkungen während einer cytostatischen

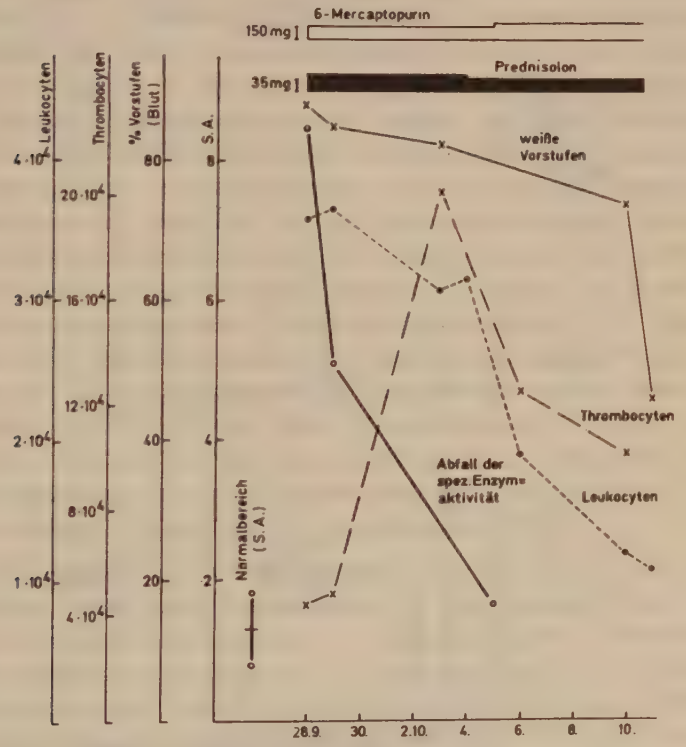

Abb.23: Thymidylat-Synthetase in weißen Blutzellen und hämatologischer Verlauf unter cytostatischer Behandlung bei Pat. Scha., chronische Myelose, akuter Schub. (Vorstufen = Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten; Spezifische Aktivität (S.A.) = mμMol Substratumsatz/min./10^{10} Zellen)

Behandlung widerspiegeln.
Inwiefern in normalen und pathologischen weißen Blut- bzw. Knochenmarkzellen die Thymidylat-Synthetase durch Cyto= statica bzw. Röntgenbestrahlung beeinflusst wird, ist in den Abbildungen 23 - 26 und in der Tabelle 15 zusammen mit

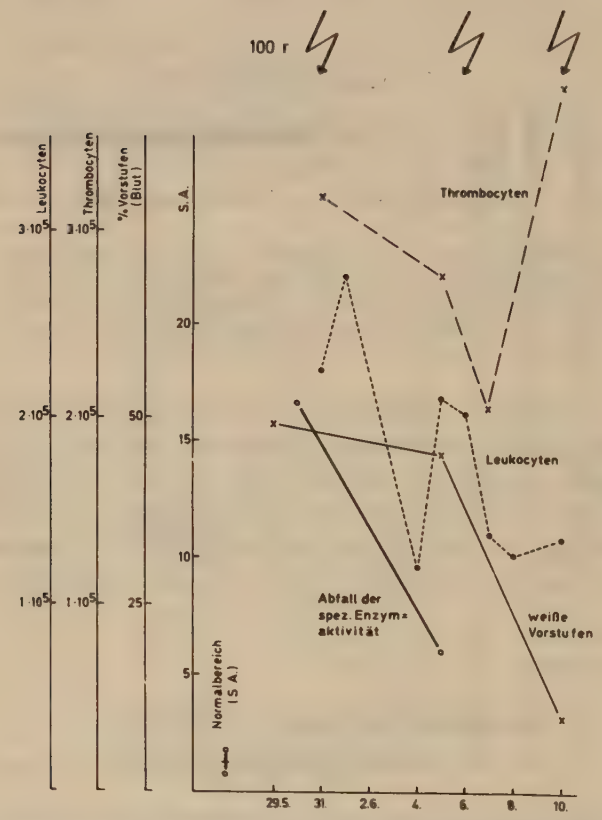

Abb.24: Thymidylat-Synthetase in weißen Blutzellen und hämatologischer Verlauf unter Röntgenbestrahlung der Milz bei Pat. Ko., chronische Myelose.
(Vorstufen und Spezifische Aktivität (S.A.) analog Abb.23)

hämatologischen Befunden dargestellt. Aus Abb.27 sind die bei perniziöser Anämie auftretenden Veränderungen im Knochenmark vor und nach Vitamin B_{12}-Injektion ersichtlich.

Unter der Therapie mit 6-Mercaptopurin und Prednisolon (Pat. Scha., akuter Schub) bzw. Röntgenbestrahlung der Milz (Pat. Ko.) war bei chronischen Myelosen schon frühzeitig eine erhebliche Hemmung der Thymidylat-Synthetase in den unreifen myeloischen Zellen des Blutes nachweisbar, während im Differentialblutbild ein verzögert beginnender Rückgang des relativen Vorstufenanteils beobachtet wurde (Abb.23 und 24). Bei Scha. zeigte sich sogar eine Normalisierung der Enzymaktivität, obwohl zu diesem Zeitpunkt das Differentialblutbild noch einen hohen Prozentsatz an Zellen aufwies, die morphologisch als Vorstufen gedeutet werden mußten. Auch bei Ko. bestand anfangs keine positive Korrelation zwischen dem Aktivitätsabfall und dem Differentialblutbild. Die Patienten reagierten jedoch mit einer starken Depression der Gesamtleukocytenzahlen. Die enzymchemischen Befunde fanden nachträglich ihre Bestätigung, indem bei beiden Patienten der prozentuale Anteil myeloischer Vorstufen nach einer Phase mäßigen Rückgangs rasch abfiel (Verlaufskurven in Abb.23 und 24). Der Abfall der Enzymaktivität bei den untersuchten Myelosen war somit ein frühzeitiges Zeichen des cytostatischen Effekts.

Die Behandlung der akuten Leukämie bei Pat. Me. (Abb.25) erfolgte durch eine Kombination von vier cytostatisch wirkenden Chemotherapeutica : Vincristinsulfat (Oncovin), Amethopterin (Methotrexat), 6-Mercaptopurin (Purinethol) und Prednisolon (Hostacortin-H). Diese auch als " VAMP "-Therapie bekannte Behandlungsmethode führte zu einer erheblichen Leukocytendepression, wobei die weißen Zellen des Blutes von 200 000/mm^3 auf 13 000/mm^3 abfielen. Im Sinne dieser hämatologischen Besserung veränderte sich auch das Differentialblutbild. Hier zeigte sich ein Paraleukoblasten-

schwund um 2/3 des Ausgangswerts. Auffallend verhielt sich die Thymidylat-Synthetase während der Behandlung. Wie aus Abb.25 ersichtlich ist, stieg die Aktivität des Enzyms unter der Chemotherapie zuerst an, um nach 4 Tagen steil abzufallen.

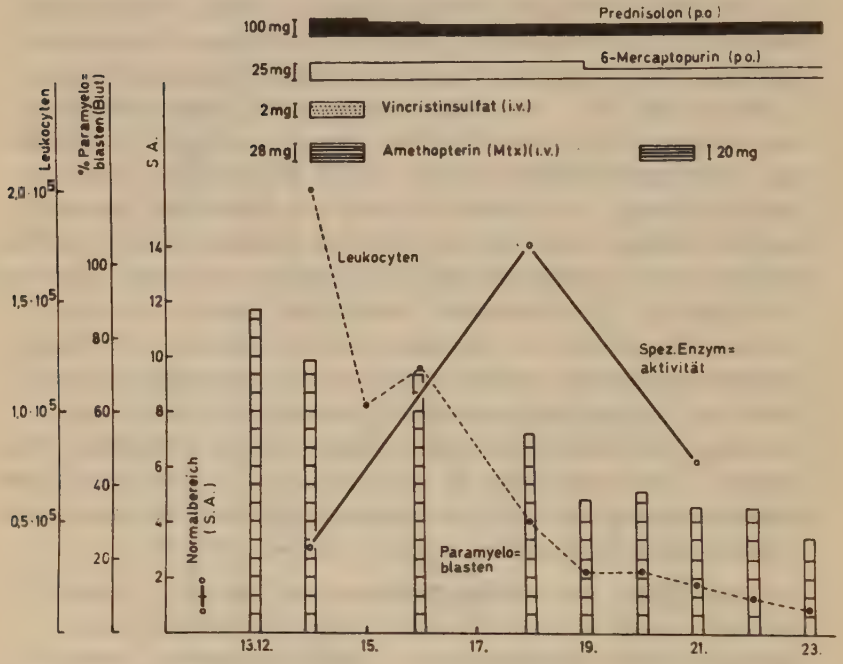

Abb.25: Thymidylat-Synthetase in weißen Blutzellen und häma= tologischer Verlauf unter cytostatischer Behandlung ("VAMP"-Therapie) bei Pat.Me. , akute Leukämie. (Spezifische Aktivität (S.A.) = mµMol Substratum= satz/min./10^{10} Zellen)

Die an normalen Knochenmarkzellen erfolgten enzymchemischen Untersuchungen bei Pat. Fr. (Abb.26 und Tab.15) dienten

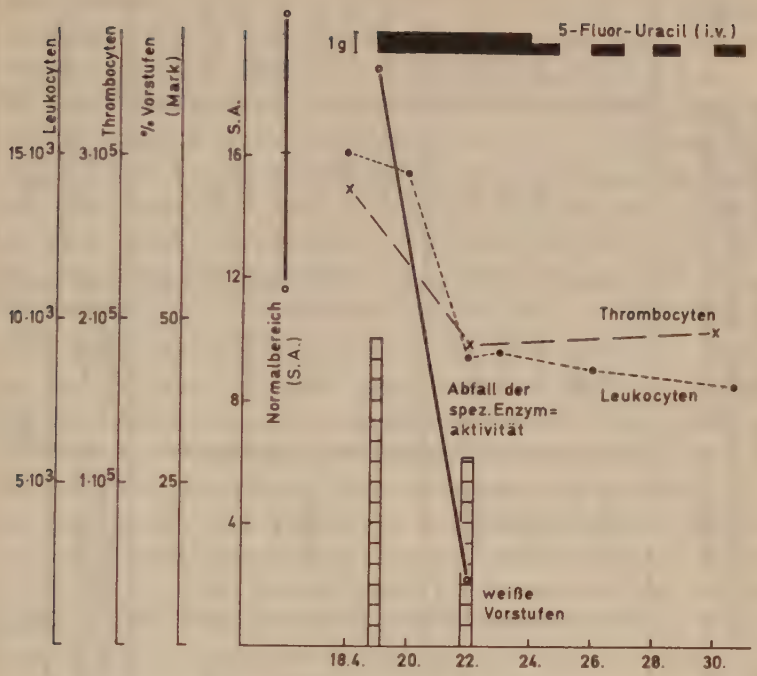

Abb.26: Thymidylat-Synthetase im Knochenmark und hämato= logischer Verlauf unter 5-Fluor-Uracil-Behandlung eines Rectum-Carcinoms bei Pat. Fr. (Vorstufen = Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten ; Spezifi= sche Aktivität (S.A.) = mµMol Substratumsatz/min./ 10^{10} Zellen)

zur Feststellung und Kontrolle möglicher cytotoxischer Nebenwirkungen des injizierten Cytostaticums (5-Fluor- -Uracil), das in diesem Fall gegen ein Rectum-Carcinom eingesetzt wurde. Die fluorierte Substanz wird im Organis= mus wie das physiologische Substrat bis zur Stufe des 5-F-dUMP enzymatisch umgewandelt. Die zuletzt genannte Ver= bindung blockiert jedoch als "falsches" Substrat der Thymi= dylat-Synthetase die Thyminmethylgruppen-de novo-Synthese

Datum	g 5-F-Uracil i.v.	BLUT		MARK			
		Leuko=cyten/mm^3	Thrombo=cyten/mm^3	Kernhaltige Zellen /mm^3	G.RZ	%myeloische Vorstufen	S.A.
18.4.	-	15200	279000	-	-	-	-
19.4.	1,0	-	-	68000	297	47	18,8
20.4.	1,0	14450	-	-	-	-	-
21.4.	1,0	-	-	-	-	-	-
22.4.	1,0	8950	184000	69750	209,5	29	2,1
24.4.	0,5	-	-	-	-	-	-
26.4.	0,5	8600	-	-	-	-	-
10.7.	1,0	14300	228000	97000	271	40	21,3
11.7.	1,0	12250	-	-	-	-	-
12.7.	1,0	11700	190000	55500	242,5	28	11,6
13.7.	1,0	9450	-	-	-	-	-
14.7.	-	9400	260000	-	-	-	-

Tab.15: Thymidylat-Synthetase im Knochenmark und hämatologische Befunde unter 5-Fluor-Uracil-Behandlung eines Rectum-Carcinoms (Pat.Fr.). G.RZ = Granulopoetische Reifungszahl berechnet nach BOCK (14). (Vorstufen und Spezifische Aktivität (S.A.) analog Abb.26)

und damit die DNS-Bildung (Abb.1, Einleitung). Der cytostatische Einfluß beschränkt sich aber nicht nur auf maligne Zellen, sondern betrifft ebenso gesundes, schnell proliferierendes Gewebe wie das Knochenmark. Bei dem Patienten handelte es sich um nicht leukämisches, hyper= regenerierendes Mark. Wie Abb.26 und Tab.15 erkennen lassen, fiel die Enzymaktivität in den gesunden Markzel= len schon innerhalb von 2 - 3 Tagen nach Beginn der Chemo= therapie erheblich ab. Damit verbunden war eine Abnahme des relativen Vorstufenanteils im Knochenmark. Die mit dem Tumorleiden einhergehende Leukocytose im Blut ver= schwand unter der Einwirkung des Cytostaticums.

Der Einfluß einer Vitamin B_{12}-Behandlung bei perniziöser Anämie auf die Thymidylat-Synthetaseaktivität im Knochen= mark ist im Zusammenhang mit hämatologischen Befunden aus Abb.27 ersichtlich. Schon bald nach der Injektion von 1000 µg B_{12} war ein Abfall der Enzymaktivität nach= weisbar. Diese sank in den untersuchten Markzellen weit unter die in nicht leukämischen Knochenmarkzellen normaler= weise ermittelten Aktivitäten. Den enzymchemischen Befunden entsprach ein innerhalb weniger Tage völliges Verschwinden der Megaloblasten im Mark. Gleichzeitig zeigte das Hämo= myelogramm einen deutlichen Rückgang des prozentualen An= teils weißer Vorstufen, zu denen auch die für perniziöse Anämien typischen Riesenmetamyelocyten und Riesenstab= kernigen gerechnet wurden. 3 - 4 Tage nach B_{12}-Gabe stie= gen die Retikulocytenwerte in charakteristischer Weise an, um nach Erreichen eines Gipfels wieder abzufallen. Diese als Retikulocytenkrise bekannte Erscheinung gilt als Zeichen für die Wirksamkeit der Therapie. Die bei per= niziösen Anämien auftretende Erhöhung der Lactat-Dehydro= genase (LDH) im Serum ist unter anderem auch als Hämo= lysezeichen zu werten. Unter der Einwirkung von Vitamin B_{12} fiel die Aktivität dieses Enzyms von über 2000 I.E. auf Normalwerte ab.

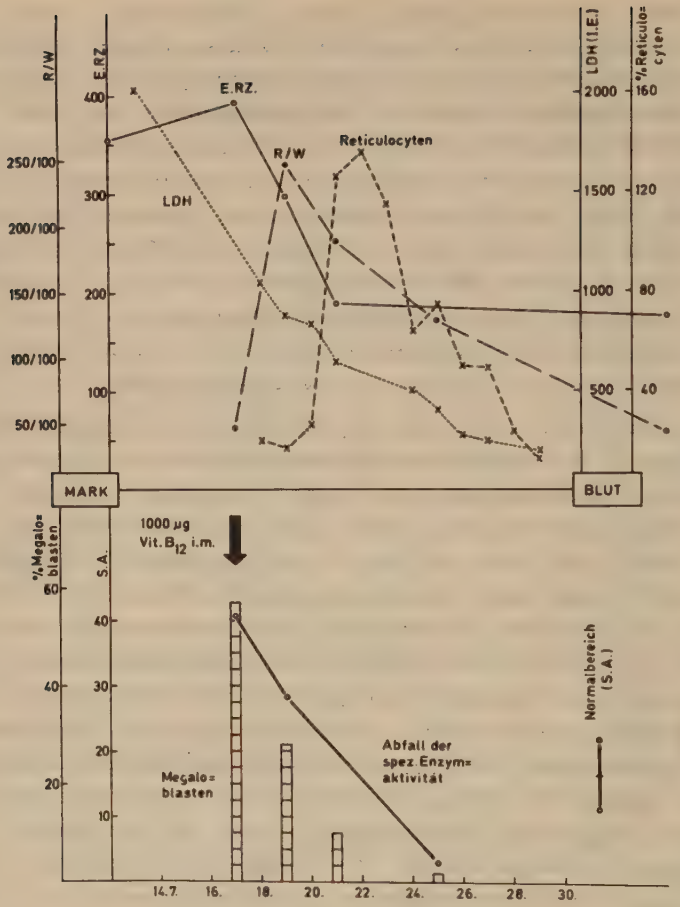

Abb.27: Thymidylat-Synthetase in Markzellen, morphologische Blut-und Markbefunde und Serum-Lactat-Dehydrogenase (LDH) bei perniziöser Anämie vor und nach Injek= tion von 1000 µg Vitamin B12. (Pat. Vo. ♂ , 64 Jahre; R/W = Verhältnis rote/weiße Vorstufen ; E.RZ. = Erythropoetische Reifungszahl berechnet nach BOCK (14) ; Spezifische Aktivität (S.A.) = mµMol Substrat= umsatz/min./10^{10} Zellen)

D I S K U S S I O N

Die Thymidylat-Synthetase, die innerhalb der DNS-Synthese (Abb.1) und somit für die Zellteilung von erheblicher Bedeutung ist, wurde in Cytolysaten von normalen und pathologischen, insbesondere leukämischen myeloischen Zellen untersucht. Bei den Aktivitätsbestimmungen des Enzyms kam in modifizierter Form eine von SMITH und GREENBERG (1964) (68) beschriebene Methode zur Anwendung.
Bevor die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erörtert und Beziehungen zu Arbeiten anderer Autoren aufgenommen werden, ist es erforderlich, der unterschiedlichen Herkunft der Thymidylat-Synthetase in den verschiedenen Publikationen Beachtung zu schenken. So arbeitete die Mehrzahl der Autoren mit hochaktiven Enzymen aus Bakterienextrakten, wobei Streptococcus faecalis und Escherichia coli sowie phageninfizierte E.coli bevorzugt wurden (FRIEDKIN und KORNBERG (30), ROBERTS und FRIEDKIN (64), McDOUGALL und BLAKLEY (56), BLAKLEY (11), PASTORE und FRIEDKIN (60), MATHEWS und COHEN (54), SMITH und GREENBERG (68), KAMMEN (47)). Andere gewannen das Enzym aus Ehrlich Ascites Tumorzellen (BOSCH, HARBERS und HEIDELBERGER (16), HARTMANN und HEIDELBERGER (37), HÄGGMARK (35)), aus Kalbsthymusextrakten (GREENBERG, NATH und HUMPHREYS (33), JENNY und GREENBERG (46)) sowie aus menschlichen Tumorgeweben (BIRNIE und HEIDELBERGER (9)). SILBER, GABRIO und HUENNEKENS (1962/63) (66,67) führten die Untersuchungen in Leukocytenextrakten durch.
Die Artspezifität der aus verschiedenen Quellen stammenden Enzyme wurde durch unterschiedliche Reinigungsgrade, die von Rohextrakten bis zu teilweise gereinigten Präparaten reichten, noch differenzierter. Diese Enzymunterschiede, zu denen überdies noch unterschiedliche Testmethoden bzw. Untersuchungsbedingungen kamen, können die zum Teil deutlichen Differenzen in den Ergebnissen erklären.

1. Optimale Reaktionsbedingungen der Thymidylat-Synthetase.

Bei den Untersuchungen über die Eigenschaften eines Enzyms ist die Frage nach den Faktoren, die für eine optimale Katalyse nötig sind, von vorrangiger Bedeutung. Die Ergebnisse von Versuchen, die den Einfluß einzelner Komponenten auf die Thymidylat-Synthetasereaktion klärten, sind aus Tabelle 2 und auch aus den Abbildungen 6a), 7a), 8 und 10 ersichtlich. Als Substrate unbedingt erforderlich waren sowohl dUMP als auch Methylen-FH_4 bzw. FH_4 und Formaldehyd. Diese Befunde sind im wesentlichen auch von anderen Autoren erhoben worden (52,63,67). Allerdings ließen sich in den Ansätzen ohne Formaldehyd minimale Restaktivitäten, die auch in den Arbeiten von LOMAX SMITH und GREENBERG (1966) sowie SILBER, GABRIO und HUENNEKENS (1963) erwähnt wurden, nachweisen. Hinsichtlich der vorliegenden Versuchsergebnisse kann angenommen werden, daß sich biosynthetisch in einer Vitamin B_6-abhängigen, von der Serin-Aldolase katalysierten Reaktion (2,43) aus geringen in den Cytolysaten enthaltenen Serinmengen aktiver Formaldehyd (Übertragung der ß-Hydroxymethylgruppe auf FH_4) in den Ansätzen bildete.

In Übereinstimmung mit den meisten Autoren (11,13,46,47,52, 54,67,70) erfolgte unter der Einwirkung von Mg^{++}-Ionen eine erhebliche Aktivierung des Enzyms. In Ansätzen ohne $MgCl_2$ wurde nur halb so viel Substrat umgesetzt wie in kompletten Reaktionsgemischen. Diese Beobachtung fand eine weitere Bestätigung dadurch, daß bei Zusatz von Mg^{++}-Ionenbindendem Titriplex ein Syntheserückgang um weitere ca. 20 % resultierte.

Als wichtig für optimale Reaktionsbedingungen erwies sich ferner der Zusatz von 2-Mercaptoäthanol. Bei vollständigem Fehlen dieser Thiolverbindung fielen die Impulsraten auf ein Drittel ab. JENNY und GREENBERG (1963), die auch mit Cystein und Glutathion gute Erfolge erzielten, sowie MATHEWS

und COHEN (54), ROBERTS (63) und auch WAHBA und FRIEDKIN (70) berichteten ebenfalls von einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch 2-Mercaptoäthanol. BLAKLEY (1963), der vorallem 2,3-Dimercaptopropanol verwendete, stellte fest, daß die Thiole nicht nur zur Stabilisierung (Oxydationsschutz) von Methylen-FH_4 beitragen (11,63), sondern auch eine enzymaktivierende Wirkung besitzen. Dies schloß er aus Versuchen, bei denen Dimercaptopropanol durch Ascorbat ersetzt wurde. Zwar konnte letztere Substanz Methylen-FH_4 vor Oxydation schützen (festgestellt durch spektrophotometrische Methode), doch blieb das Enzym inaktiv. Die Reaktion kam erst in Gang nach Zusatz von Dimercaptopropanol zu den Ascorbat-haltigen, inaktiven Systemen. Daß BLAKLEY und McDOUGALL (1962) sowie BLAKLEY (1963) nur bei Anwesenheit von Thiolen, insbesondere von 2,3-Dimercaptopropanol, Thymidylat-Synthetaseaktivität in ihren Inkubaten nachweisen konnten, wurde von HARTMANN (1964) als Inaktivierung des Enzyms während der Reinigung aus Streptococcus faecalis-Extrakten gedeutet. Die Untersuchungen von HARTMANN und HEIDELBERGER (37) ergaben keinen Anhalt für einen aktivitätsfördernden Einfluß von Thiolen oder von Ascorbinsäure.

Die zur Halbsättigung des Enzyms erforderlichen Substratkonzentrationen (Michaeliskonstante) wurden für dUMP und FH_4 nach der Methode von LINEWEAVER und BURK (51) bestimmt (Abb.6b), 7b), 15, 17 und 19) und sind in Tabelle 14 zusammengefaßt. Wie diese erkennen läßt, hat dUMP (K_m = 5-6 x 10^{-5}M) eine doppelt so hohe Affinität zum Enzym wie FH_4 (1,2-1,3 x 10^{-4}M).
JENNY und GREENBERG (46), die zwar zur Halbsättigung ihrer teilweise gereinigten Enzyme aus Thymusextrakten junger Kälber sowohl von FH_4 (3,8 und 4,5 x 10^{-5}M) als auch von dUMP (2 x 10^{-5}M) geringere Konzentrationen benötigten, fanden in Bezug auf die Affinität zum Enzym dasselbe Verhältnis zwischen dUMP und FH_4.

Die an teilweise gereinigten Enzymen aus Escherichia coli vorgenommenen Untersuchungen von WAHBA und FRIEDKIN (70) ergaben für beide Substrate identische Michaeliskonstanten ($4{,}5 \times 10^{-6}$M). FH_4 und dUMP besaßen also die gleiche Affinität zum Enzym. Während BLAKLEY (11) mit teilweise gereinigten Enzymen aus Str.faecalis für dUMP eine in derselben Größenordnung liegende K_m ($5{,}7 \times 10^{-6}$M) erhielt, mußten MATHEWS und COHEN (54) 3 - 6fach höhere dUMP-Konzentrationen ($1{,}7 - 3 \times 10^{-5}$M) zur Halbsättigung phageninduzierter Thymidylat-Synthetase aus E.coli einsetzen. HARTMANN und HEIDELBERGER (1961) (37) fanden Konzentrationen von $3{,}7 \times 10^{-5}$M bzw. $5{,}4 \times 10^{-5}$M dUMP.

2. Bedeutung der Aktivierung und Hemmung des Folat-Reductasesystems für die Thyminnucleotid-Synthese.

Da Tetrahydrofolsäure bei der Substratmethylierung, zum Teil aber auch schon durch vorzeitige Inaktivierung, zu Dihydrofolsäure oxydiert wird, kann an der Bedeutung eines FH_4-regenerierenden Systems kein Zweifel bestehen. Die Recyclierung der Thymidylat-Synthetasereaktion kann aber nur bei gleichzeitiger FH_2-Reductaseaktivität, die wiederum von der Anwesenheit reduzierten Pyridin-Nucleotids ($NADPH+H^+$) als Wasserstoffdonator abhängt, gewährleistet sein.

Daß in Cytolysaten von unreifen myeloischen Zellen FH_2-Reductaseaktivität deutlich nachweisbar ist, geht aus mehreren Untersuchungen von WILMANNS (77,78,79) sowie BERTINO et al. (5,6) hervor und konnte in der vorliegenden Arbeit auch dadurch bestätigt werden, daß bei Zusatz von $NADPH+H^+$ eine um über 40 % höhere Umsatzrate bestimmt wurde (Abb.8). Ein Vergleich der beiden Abbildungen 7a) und 9 zeigt, daß sich die zur Erreichung des Reaktionsoptimums einzusetzende FH_4-Menge bei Verwendung von $NADPH+H^+$ um die Hälfte einsparen läßt. Eindrucksvoller ließ sich die Wir=

kung von $NADPH+H^+$ durch Versuche demonstrieren, bei denen die Inkubationsansätze statt FH_4 inaktive FH_2 enthielten. Während bei Zusatz von FH_2 in Gegenwart von $NADPH+H^+$ immerhin noch rund ein Drittel der optimalen (FH_4 und $NADPH+H^+$) Thymidylat-Synthetaseaktivität gemessen werden konnte, war in $NADPH+H^+$-freien Ansätzen fast keine Aktivität nachzuweisen (Abb.20). Die in den Cytolysaten enthaltene FH_2-Reductase bildete somit unter Beteiligung von $NADPH+H^+$ die zur Thymidylat-Synthese erforderliche Tetrahydrofolsäure, blieb jedoch ohne den Wasserstoffdonator inaktiv.

JENNY und GREENBERG (1963) (46), die ihren teilweise gereinigten Enzympräparaten aus Kalbsthymusextrakten FH_2-Reductase zusetzten, konnten in Übereinstimmung mit WAHBA und FRIEDKIN (70) sowie BLAKLEY und McDOUGALL (13) (bakterielle Thymidylat-Synthetase) $NADPH+H^+$ als wirksames Reduktionsmittel bestätigen.
HARTMANN und HEIDELBERGER (37) konnten keinen Einfluß von reduziertem $NADP^+$ in ihren Ansätzen feststellen. Die Autoren führten dies nicht auf eine ausgebliebene FH_4-Regeneration zurück, sondern auf überschüssige Mengen an Tetrahydrofolsäure und Formaldehyd in ihren Inkubaten, die einen kontinuierlichen Ablauf der Thymidylat-Synthetasereaktion auch ohne Neubildung von FH_4 optimal gewährleisteten.

WELLS und WINZLER (73) sowie WINZLER, WILLIAMS und BEST (81), die in vitro-Versuche an menschlichen Leukocyten vornahmen, beschrieben eine durch Folsäureantagonisten verursachte Verminderung der Thymidylat-Synthese. Verantwortlich hierfür ist die Hemmung der FH_2-Reductase. Folsäureantagonisten (Aminopterin und Amethopterin bzw. Methotrexat), die sich strukturchemisch nur minimal von der Folsäure unterscheiden, blockieren schon in geringsten Konzentrationen das von der FH_2-Reductase katalysierte FH_4-regenerierende System (Gleichung 2). WERKHEISER (74), der die FH_2-Reductase in Zellkulturen untersuchte, konnte eine im Vergleich zu Di-

hydrofolsäure etwa 20 000 mal so große Affinität von Metho= trexat zum Enzym feststellen. Da diese extrem starke Hemmung auch durch zusätzliche Gaben großer FH_2-Mengen praktisch nicht kompensiert werden kann, wurde die Hemmwirkung als "pseudo-irreversibel" (74) bezeichnet.

Da die Hemmung der Regeneration von FH_4 den kontinuier= lichen Ablauf der Substratmethylierung und damit der DNS-Synthese in Mitleidenschaft zieht, ist der durch Folsäure= antagonisten bedingte cytostatische Effekt verständlich. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Angabe von WAHBA und FRIEDKIN (69), daß kleine Mengen der Folsäureantagonisten biologisch zu den entsprechenden FH_4-Derivaten reduziert werden, die dann im Gegensatz zu den Ausgangsverbindungen die Thymidylat-Synthetase direkt hemmen.

In Reaktionsgemischen ohne reduzierte Pyridin-Nucleotide (inaktive FH_2-Reductase !) kann bei Zusatz von Methotrexat keine wirksame Beeinträchtigung des dUMP-Umsatzes erwartet werden, wie die Ergebnisse in Tabelle 6 und in Abbildung 20 bestätigen. Die Wirkung von Methotrexat auf die Thymidylat-Synthese ist um so ausgeprägter je weniger FH_4 den Ansätzen von Anfang an zur Verfügung steht. Überschüssige Mengen FH_4 entheben die Thymidylat-Synthetasereaktion sozusagen der Notwenigkeit einer laufenden Regenerierung von FH_4, über= gehen also gleichsam die "Störstelle" im Cyclus (Abb.1). Somit ist die unterschiedliche Wirkung von Methotrexat in den Versuchen einleuchtend, bei denen die Ansätze einmal mit FH_4 und das andere Mal mit FH_2, jeweils in Gegenwart von $NADPH+H^+$, inkubiert wurden. Im letzteren Fall konnte Methotrexat einen fast doppelt so hohen Rückgang der Thymin= methylgruppen-Synthese bewirken (Abb.20). Ohne Zusatz von $NADPH+H^+$ ließ sich weder in FH_4- noch in FH_2-haltigen Re= aktionsgemischen ein wesentlicher Einfluß von Methotrexat feststellen.
SILBER, GABRIO und HUENNEKENS (1963), die auch leukämische Leukocyten untersuchten, konnten keine Wirkung mit Aminopterin

erzielen. Dieser Befund dürfte dadurch bedingt sein, daß die Autoren mit teilweise gereinigten Thymidylat-Synthetase-Präparaten arbeiteten und die Inkubation ohne $NADPH+H^+$ vornahmen.

3. 5-Fluor-Uracilderivate und deren Hemmechanismus.

Substanzen, die unmittelbar oder erst nach entsprechender Umwandlung eine Blockierung der Thymidylat-Synthetase bewirken, sind in den 5-Fluor-Uracilderivaten erkannt worden. Die Folge dieses Blocks ist eine starke Hemmung der DNS-Synthese (16) mit gleichsinniger Auswirkung auf die Mitoserate der Zellen. Der RNS- und Proteinumsatz ist vergleichsweise nur wenig beeinträchtigt (21). Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß die Matrizeneigenschaften der RNS durch eingebautes 5-Fluor-Uracil verändert werden (36).

Die Atomradien von Fluor (1,35 Å) und Wasserstoff (1,20 Å) liegen in derselben Größenordnung, so daß den Enzymen die Unterscheidung zwischen 5-F-Uracil und der regulären Verbindung nicht möglich ist (36). So erklärt es sich, daß 5-F-U in derselben Weise wie nicht fluoriertes Uracil über 5-F-Uridin bzw. 5-F-desoxyuridin in 5-F-UMP bzw. 5-F-dUMP enzymatisch umgewandelt wird unter Beteiligung von Phosphorylasen und Kinasen (16,21). Während aber 5-F-UMP weiter zur Di- und Triphosphatverbindung phosphoryliert wird, um in die RNS eingebaut zu werden (21), ist die weitere Umwandlung von 5-F-dUMP in Richtung DNS ausgeschlossen, da die Bindung von Fluor an dem C-Atom 5 eine Methylierung zu Thymidylat verhindert (21,24). Dabei ist die Affinität des 5-F-dUMP zur Thymidylat-Synthetase so groß, daß schon kleinste Mengen davon zu einer effektiven Enzymhemmung ausreichen.

HEIDELBERGER et al. (38) machten die Beobachtung, daß in Transplantationstumoren Uracil viel stärker zur DNS-Synthese

herangezogen wird als in den meisten normalen Geweben, wofür eine in den Tumoren stark herabgesetzte Fähigkeit zum Abbau des Uracils verantwortlich sein soll. In gleicher Weise verhält es sich mit 5-F-Uracil, wie die Untersuchungen von CHAUDHURI, MONTAG und HEIDELBERGER (21) ergaben, allerdings mit dem Unterschied, daß die fluorierte Substanz nur bis zur Stufe des 5-F-dUMP am DNS-Stoffwechsel teilnimmt, dann aber über die Blockierung der Thymidylat-Synthetase einen hemmenden Einfluß auf die DNS-Synthese ausübt.
In Tumoren, die gegen 5-F-U resistent geworden sind, ist die Umwandlung in 5-F-dUMP nicht mehr möglich, weil der Schritt von 5-F-U zum entsprechenden Desoxyribosid gestört ist (35, 62). Durch Verabreichung von 5-F-desoxyuridin bzw. dessen Phosphat läßt sich die 5-F-U-Resistenz umgehen (36). Die von HEIDELBERGER in die Chemotherapie eingeführten, in Stellung 5 fluorierten Uracil- bzw. Desoxyuridinverbindungen werden heute vorwiegend bei der Behandlung von Rectum- und Colon-Carcinomen eingesetzt.

Drei der 5-F-Uracilderivate wurden auf ihre Hemmwirkung in Cytolysaten von myeloischen Vorstufen untersucht. Wie Tab.4 zeigt, war die Hemmung der Thymidylat-Synthese um so intensiver je näher, chemisch gesehen, der eingesetzte Inhibitor dem für die Hemmwirkung entscheidenden 5-F-dUMP stand. Bei 5-F-Uracil war die Wirkung am geringsten. 5-F-dUMP, das als "falsches" Substrat sich unmittelbar mit dem Enzymprotein verbindet, konnte die Methylierung des regulären Substrats schon in Konzentrationen von 10^{-9}M deutlich einschränken und in Konzentrationen von 10^{-4}M fast komplett verhindern. Die Inkubationsansätze enthielten kein zusätzliches Desoxyribose-1-phosphat oder ATP. Da aber die beiden chemischen Vorläufer von 5-F-dUMP eine deutliche, wenn auch nicht erhebliche Wirkung entfalteten, muß angenommen werden, daß die Cytolysate sowohl die zur 5-F-dUMP-Synthese erforderlichen Substrate (Desoxyribose-1-phosphat, ATP) als auch

Enzyme (Phosphorylase, Kinase), zumindest in geringen Konzentrationen, enthielten.

Die Möglichkeit einer direkten Einwirkung von 5-F-Uracil bzw. 5-F-desoxyuridin auf die Thymidylat-Synthetase kann zwar diskutiert werden, ist jedoch nicht wahrscheinlich. Dies geht auch aus Beobachtungen von SILBER, GABRIO und HUENNEKENS (67) hervor, deren teilweise gereinigte Thymidylat-Synthetase aus leukämischen Leukocyten durch 5-F--Uracil ebensowenig wie durch 5-F-desoxyuridin gehemmt wurde. Zusatz von Desoxyribonucleosid-Kinase und ATP zu den Ansätzen, welche 5-F-desoxyuridin in einer Konzentration von 10^{-4}M enthielten, bewirkte jedoch eine völlige Hemmung des dUMP-Umsatzes. Die Ergebnisse der Autoren sind in doppelter Hinsicht bemerkenswert, indem sie einmal zeigen, daß die Vorläufer von 5-F-dUMP als solche, selbst in hohen Konzentrationen (10^{-4} bzw. 10^{-3}M), die Thymidylat-Synthetase nicht hemmen, zum anderen bestätigen, daß das durch Phosphorylierung von 5-F-desoxyuridin sich bildende Folgeprodukt für die Hemmwirkung entscheidend ist.

Interessant sind die Versuche, die HARTMANN und HEIDELBERGER (37) mit Chlor-, Brom- und Jod-halogenierten Desoxyuridinen durchführten. Da der Atomradius dieser Halogene im Gegensatz zu Fluor der Größenordnung einer Methylgruppe (2,0 Å) entspricht, verhalten sich die in C_5-Stellung mit Chlor, Brom bzw. Jod halogenierten Desoxyriboside biologisch wie ein Thymidinanalog (36). Die Phosphorylierung zu den dem dUMP analogen Verbindungen geschieht deshalb nicht durch die Desoxyuridin-Kinase, sondern durch die Thymidin-Kinase. Weitere Umwandlungen bis zur Di- und Triphosphatstufe mit anschließendem Einbau in die DNS können somit als möglich angenommen werden. Nur unphysiologisch hohe Konzentrationen der untersuchten Substanzen bewirkten eine Hemmung der Thymidylat-Synthetase, sofern die Inkubationsansätze Thymidin-Kinase und ATP enthielten. Erwar=

tungsgemäß (Analogie der halogenierten Verbindungen zu Thymidin !) entspricht diesem Befund der bei eigenen Versuchen (Teil B, II) festgestellte begrenzte Einfluß von dTMP auf die Substratmethylierung.

Es besteht die Frage, ob die durch 5-F-dUMP verursachte Enzymhemmung kompetitiv oder nicht kompetitiv ist, auch wenn auf Grund der analogen Struktur von dUMP und 5-F-dUMP eine Hemmung vom kompetitiven Typ fraglos vorzuliegen scheint. Letzteres hieße, daß physiologisches Substrat (dUMP) und Inhibitor (5-F-dUMP) um die gleiche Bindung am Enzym konkurrieren. Zur genaueren Beurteilung dieser Frage lassen sich die Darstellungen (LINEWEAVER und BURK) der Abbildungen 15, 17 und 19 heranziehen. Der Zusatz der Inhibitoren bewirkt eine scheinbare Vergrößerung von K_m für dUMP, jedoch keine Änderung von v_{max}. Hieraus geht hervor, daß 5-F-desoxyuridin und 5-F-dUMP - in Bezug auf dUMP - die Thymidylat-Synthetase kompetitiv hemmen, wobei 5-F-desoxyuridin ebenfalls in phosphorylierter Form in Konkurrenz zum regulären Substrat (dUMP) tritt. Die Abbildungen 14 und 18 bestätigen diese Befunde ebenfalls, indem durch Erhöhung der dUMP-Konzentration bei konstanter Inhibitorkonzentration (5-F-dUR bzw. 5-F-dUMP) die prozentuale Hemmung des Enzyms vermindert wird. Auf FH_4 bezogen verhält sich 5-F-desoxyuridin nicht kompetitiv (Abb.17). Zunehmende FH_4-Konzentrationen bei konstanter Inhibitorkonzentration (5-F-dUR) haben keine Verminderung der Enzymhemmung zur Folge (Abb.16). Dies ist zu erwarten, da es unwahrscheinlich ist, daß der Inhibitor neben der Ansatzstelle für dUMP auch noch den Rezeptor für Methylen-FH_4 blockiert. Daß die beiden in der Thymidylat-Synthetasereaktion umgesetzten Substrate, Methylen-FH_4 und dUMP, an verschiedenartige Enzymrezeptoren gebunden werden, ist auch den Untersuchungen von BLAKLEY (11) zu entnehmen, der durch kinetische Beobachtungen und durch Hemmversuche den Enzymmechanis-

mus zu klären versucht hat.

Das Verhältnis K_m/K_i (37) drückt am besten die hohe Affinität von 5-F-dUMP zur Thymidylat-Synthetase aus (K_i = $1{,}48 \times 10^{-8}$M 5-F-dUMP, $K_m = 5{,}42 \times 10^{-5}$M dUMP, K_m/K_i = $3{,}6 \times 10^{3}$). Hieraus läßt sich folgern, daß bei der Hemmung mit 5-F-dUMP die Affinität eines Inhibitormoleküls zum Enzym der von 3600 Substratmolekülen entspricht. Obwohl die sehr starke Affinität von 5-F-dUMP zum Enzym auch von anderen Autoren erkannt wurde, weichen die im einzelnen ermittelten Werte sowohl von den oben beschriebenen als auch untereinander ab.
HARTMANN und HEIDELBERGER (1961), die ebenfalls eine kompetitive Hemmung beschrieben, berechneten ein K_m/K_i-Verhältnis von $1{,}7 \times 10^{3}$ ($K_m = 3{,}7 \times 10^{-5}$M dUMP, $K_i = 2{,}2 \times 10^{-8}$M 5-F-dUMP). Bei BLAKLEY (1963), dessen Hemmversuche an Str.faecalis-Extrakten erfolgten, betrug der Quotient $1{,}4 \times 10^{3}$ ($K_m = 5{,}7 \times 10^{-6}$M dUMP, $K_i = 4 \times 10^{-9}$M 5-F-dUMP).
MATHEWS und COHEN (54) (phagen-infizierte E.coli-Extrakte) fanden den geringsten Unterschied zwischen der Affinität von Inhibitor und Substrat zum Enzym ($K_m = 1{,}8 \times 10^{-5}$M dUMP, $K_i = 2{,}9 \times 10^{-8}$M 5-F-dUMP, $K_m/K_i = 0{,}6 \times 10^{3}$).
Obwohl letztere nicht daran zweifelten, daß dUMP und 5-F-dUMP vom gleichen Rezeptor des Enzyms gebunden werden, allerdings der Inhibitor um das Vielfache stärker, bezeichneten sie die Hemmung durch 5-F-dUMP als "nicht kompetitiv" (in vorinkubierten Ansätzen), wobei sie einräumten, daß diese wahrscheinlich nicht dem klassischen nicht kompetitiven Typ entspricht. Während sie ohne Präinkubation mit 5-F-dUMP in einer Konzentration von weniger als 10^{-7}M keine signifikante Hemmung erreichten, konnten sie bei höheren Konzentrationen eine kompetitive Hemmung feststellen.
BLAKLEY, der seinen Untersuchungen zufolge die Hemmung auch als nicht kompetitiv beurteilte, ging ebenfalls einen Kompromiß ein, indem er die Bezeichnung "pseudo-nichtkompetitiv"(11)

wählte.

In engem Zusammenhang mit den vorhergehenden Erörterungen steht die Frage nach der Reversibilität der Bindung zwischen Enzym und 5-F-dUMP.
Auf Grund der Beobachtung, daß in nicht vorinkubierten Ansätzen das Substrat mit dem in wesentlich niedrigerer Konzentration eingesetzten Inhibitor um die Bindungsstelle am Enzym konkurriert, daß aber bei 5-minütiger Präinkubation von Enzym und 5-F-dUMP ohne dUMP auch große Substratmengen die Enzym-Inhibitor-Bindung nicht mehr aufzulösen vermögen, nahmen MATHEWS und COHEN (1963) eine irreversible Bindung an. Ferner entschieden sie sich auf Grund einer von ACKER= MANN und POTTER (1) beschriebenen Versuchsanordnung für einen "stöchiometrischen" Hemmungstyp. Ein solcher wurde auch schon von WERKHEISER (1961) (74) in Bezug auf die Hemmung der Dihydrofolsäure-Reductase durch Aminopterin oder Amethopterin beschrieben. Die stöchiometrische Bindung zwischen Enzym und Inhibitor, die auch als 1:1 Beziehung zwischen Inhibitormolekülen und Enzymrezeptoren aufgefaßt werden kann, ermöglicht eine "Titration" der Enzymaktivität mit 5-F-dUMP-Molekülen (54). Dies bedeutet, daß bei der hohen Affinität von 5-F-dUMP zur Thymidylat-Synthetase die gesamte Inhibitormenge an das Enzym gebunden wird und somit eine gegebene Thymidylat-Synthetasemenge mit 5-F-dUMP und umgekehrt "titriert" werden kann. BLAKLEY kam zu ähnlichen Ergebnissen, bezeichnete die Bindung jedoch als "pseudo-irreversibel" (ACKERMANN und POTTER).
Die Untersuchungen von HEIDELBERGER, GHOBAR, BAKER und MUKHERJEE (1960) (39) an Tumoren in vivo zeigten, daß noch längere Zeit nach Absetzen von 5-F-U die Hemmung der Thymidylat-Synthetase andauert. Dieses Phänomen wurde auf eine irreversible Bindung zwischen Enzym und Inhibitor zurückgeführt.

Die eigenen Untersuchungen sprechen eher für eine reversible

Bindung. Allein schon der Befund einer kompetitiven Hemmung setzt die Reversibilität voraus. Für diesen Hemmungstyp ist es doch charakteristisch, daß durch genügend hohe Substratmengen der Inhibitor reversibel verdrängt werden kann. Auch ließ sich kein Anhalt dafür finden, daß eine Präinkubation der Ansätze (ohne Substrat, jedoch mit 5-F--dUMP) das Ausmaß und die Art der Enzymhemmung beeinflußt, wie es MATHEWS und COHEN bei phagen-induzierter Thymidylat-Synthetase festgestellt hatten.

HARTMANN und HEIDELBERGER (37) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß die Hemmung in präinkubierten Ansätzen nicht größer ist als in Ansätzen, in denen dUMP und 5-F-dUMP gleichzeitig dem Enzym angeboten wurden. Außerdem ließen sich in ihren Ansätzen selbst kleine Enzymmengen niemals vollkommen durch 5-F-dUMP inaktivieren, so daß eine "Titration" des Enzyms mit dem Hemmstoff ausgeschlossen war. MATHEWS und COHEN, deren Befunde, vor allem was den Hemmechanismus anbetrifft, im Widerspruch dazu standen, deuteten die Möglichkeit von Unterschieden zwischen phagen-induzierter und Säugetier-Thymidylat-Synthetase (Maus) an.

4. Einfluß physiologischer Verbindungen auf den dUMP-Umsatz.

Die Hemmversuche der vorliegenden Arbeit beschränkten sich nicht nur auf unbiologische Stoffe, sondern berücksichtigten auch physiologische Verbindungen, da diese möglicherweise durch Hemmung der Thymidylat-Synthetase regulierende Stoffwechselfunktionen ausüben. Dabei ging es vor allem um die Frage, inwieweit das Produkt der Thymidylat-Synthese (dTMP) sowie das Endprodukt zweier sich anschließender Phosphorylierungen (dTTP) rückwirkend den dUMP-Umsatz beeinflussen.
Von dTTP ist bekannt, daß es verschiedene Reaktionen inner-

halb des Nucleotid-Stoffwechsels durch allosterische Hem= mung im Sinne einer negativen Rückkoppelung beeinflußt. So wird die Phosphorylierung der beiden Desoxyriboside Desoxyuridin (53) und Thymidin (53,77) zu dUMP bzw. dTMP durch Thymidintriphosphat (dTTP) ebenso gehemmt wie die Desaminierung von dCMP zu dUMP (53).

Obwohl beschrieben worden ist, daß dTTP weder die FH_2-Re= ductase noch die Thymidylat-Synthetase hemmt (36), erfolgten Versuche, bei denen nochmals die Wirkung dieser Verbindung überprüft wurde. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, spielt dTTP als Inhibitor keine Rolle. Mit dTMP in einer Konzen= tration von 10^{-4}M ließ sich eine 50 %ige Hemmung der Thymi= dylat-Synthetase feststellen.
Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen von SILBER, GABRIO und HUENNEKENS an ebenfalls aus weißen Blutzellen stammenden Enzympräparaten. (Vollständige Hemmung der Enzymreaktion bei 1,25 x 10^{-3}M dTMP.) Nicht phosphorylier= te Verbindungen wie Thymin und dessen Desoxyribosid Thymi= din waren nach diesen Autoren sehr wenig wirksam. Gar keinen Einfluß auf die Bildung von Thymidylat zeigten dTTP und auch DNS.

BLAKLEY stellte durch kinetische Untersuchungen an Enzymen aus Str.faecalis-Extrakten fest, daß die durch dTMP be= wirkte Hemmung kompetitiv zu dUMP (K_i = 2,4 x 10^{-5}M), zu FH_4 aber nicht kompetitiv (K_i = 7,6 x 10^{-6}M) ist (11). Der Quotient K_m/K_i in Bezug auf dUMP (K_m = 5,7 x 10^{-6}M) beträgt also rund 0,25. Hieraus kann geschlossen werden, daß dTMP - verglichen mit dUMP - eine vierfach geringere Affinität zum Enzym aufweist, was bedeutet, daß von dTMP mindestens 4-fach so große Mengen wie vom Substrat erfor= derlich sind, um überhaupt gleichwertig um die Bindungs= stelle am Enzym konkurrieren zu können.
WELLS (72), der ^{14}C-2-Thymin in Suspensionen leukämischer Blutzellen einsetzte, stellte fest, daß über 90 % der

markierten Verbindung in die DNS, aber nichts in säure= lösliche Nucleotide inkorporiert wurde. Dagegen ließen sich andere markierte Pyrimidine sowie Purine in den säure= löslichen Nucleotiden nachweisen. SILBER und Mitarbeiter (1963), die diese Befunde zu deuten versuchten, meinten, daß der Pool an freiem Thymidylat in den Leukocyten sehr klein sei und neu synthetisiertes dTMP rasch zu dTTP umge= setzt und dann in die DNS eingebaut werde (67). Für die Richtigkeit dieser Deutung lieferten die Untersuchungen von BIANCHI (8) Anhaltspunkte. Ebenso müssen auch die von S. SCHOLLENBERGER (persönl.Mitteilung) gewonnenen Ergebnisse verstanden werden, denen Untersuchungen an Cytolysaten mye= loischer Zellen, mit ^{14}C-markiertem Thymidin bzw. dTMP als Substrate, zugrunde lagen.
Der rasch ablaufenden Utilisation von dTMP zufolge ist es unwahrscheinlich, daß in den Zellen derartig hohe Konzentra= tionen dieser Verbindung, wie sie in vitro (Tab.5) vorlagen, erreicht werden, zumal der dUMP-Umsatz ohnehin relativ niedrig ist (58). Somit kann der experimentell festgestellten Enzym= hemmung durch dTMP keine physiologische Bedeutung beigemessen werden.

5. Enzymchemische Deutung morphologischer Befunde.

Wie die Untersuchungen an weißen Blut- und Knochenmarkzel= len ergaben, wurde grundsätzlich in allen Zellen, sowohl in normalen als auch in pathologischen, die Thymidylat-Synthetase gefunden, wenn auch in sehr unterschiedlichem Ausmaß (Tab. 8-13). Insgesamt jedoch waren die ermittel= ten Aktivitäten, verglichen mit der FH_2-Reductase (77,79), um ein Vielfaches geringer. Dies läßt sich vereinbaren mit der von SILBER et al. (67) sowie von O'BRIEN (58) vertrete= nen Auffassung, wonach die Thymidylat-Synthetase das limi= tierende Enzym der Thyminmethylgruppen-de novo-Synthese ist.

Die niedrigsten spezifischen Enzymaktivitäten wurden in

normalen Leukocyten des Blutes sowie in peripheren Lymphocyten bei chronischen Lymphadenosen bestimmt. Gemäß den Tabellen 8 und 9 betrugen die Umsätze in diesen als ausgereift geltenden Zellen nur etwa 1 mμMol dUMP/min./10^{10} Zellen. Gleichartige Befunde sind von SILBER, GABRIO und HUENNEKENS erhoben worden, die allerdings, vermutlich methodisch bedingt, in diesen Zellen gar keine Thymidylat-Synthetaseaktivität nachweisen konnten. Zwei andere Enzyme, die in enger Beziehung zur Thymidylat-Synthese stehen, nämlich die Thymidin-Kinase (77) und die FH_2-Reductase (5,77,78,79), waren in diesen Zellen ebenfalls nur gering oder gar nicht nachweisbar. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die untersuchten Zellen zur DNS-Synthese nicht mehr oder nur noch unzureichend imstande sind, zumal es auch nicht gelang, ^{14}C-markierten Formaldehyd in die DNS dieser Leukocyten zu inkorporieren (SCOTT (65), ASTALDI (3)). Auch Tritium-markiertes Thymidin konnte nur bei einem kleinen Teil der Zellen in der DNS wiedergefunden werden (CRADDOCK und NAKAI (25)).

In den Zellen des Blutes und des Knochenmarks bei akuten und chronischen Leukämien wurden deutlich höhere Enzymaktivitäten gefunden (Tab. 7, 10 und 11, Abb.22). Zweifellos wurden die erhöhten Thymidylat-Synthetaseaktivitäten in den peripheren Zellen durch eine mehr oder minder starke Ausschwemmung unreifer noch teilungsfähiger Zellen des Knochenmarks ins Blut verursacht, was durchaus als pathologisch zu werten ist. Ob aber die gesteigerten Aktivitäten für Leukämiezellen typisch sind, kann nur durch einen Vergleich mit enzymchemischen Befunden in normalen Vorstufen (Tab.12) entschieden werden.
Die durchschnittlichen spezifischen Enzymaktivitäten waren in leukämischen Markzellen höher als in normalen weißen Vorstufen. Innerhalb der Leukämien lagen die Durchschnittswerte bei der akuten Form am höchsten. Diese auf Durchschnittsaktivitäten bezogenen Unterschiede sind allerdings nicht

sehr erheblich und verlieren im Einzelfall ganz an Bedeutung. Abbildung 22 zeigt nämlich, daß sich die Streuungsbreiten der Aktivitätswerte bei beiden Leukämieformen entsprechen, und daß die in normalen Markzellen ermittelten Werte innerhalb dieser Streuungsbreiten liegen.
Es kann sicher angenommen werden, daß eine erhöhte Aktivität der Thymidylat-Synthetase nicht nur für Leukämiezellen, sondern für alle unreifen, also auch für normale noch undifferenzierte Zellen kennzeichnend ist. Diese Ansicht wird auch von SILBER (67) geteilt.
Die FH_2-Reductase, die zwar erheblich aktiver als die Thymidylat-Synthetase ist, erfährt im Vergleich zu nicht leukämischen Knochenmarkzellen auch keine zusätzliche Aktivitätssteigerung in unreifen Zellen bei chronischen Myelosen bzw. in Paraleukoblasten bei akuten Leukämien (77). Diese Übereinstimmung kann aus der engen Beziehung zwischen den beiden Enzymen FH_2-Reductase und Thymidylat-Synthetase verstanden werden, die synergistisch im Dienste der Thymidylat-Synthese stehen (Abb.1).

Bei akuten Leukämien, aber auch bei chronischen Myelosen wurden im Knochenmark stets höhere Enzymaktivitäten als in den peripheren Zellen gefunden (Tab.10 und 11). Sowohl die Untersuchungen von WILMANNS (77) über die Thymidin-Kinase als auch die von KILLMANN (48) über die Thymidin-^{3}H-Aufnahme durch DNS-synthetisierende Zellen ergaben bei akuten Leukämien gleichartige Unterschiede. WILMANNS, der sich bei der Deutung dieser Befunde auf KILLMANN bezieht, nimmt an, daß eine Leukoblastenpopulation bei akuten Leukämien sich aus proliferierenden, vorwiegend im Knochenmark befindlichen und aus nicht proliferierenden, hauptsächlich ins periphere Blut ausgeschleusten Zellen zusammensetzt. Die Aktivität der Thymidin-Kinase und der Thymidin-^{3}H-Markierungsindex sollen von dem " Verhältnis, in dem sich teilende und nicht mehr teilungsfähige Leukoblasten vom Knochenmark ins periphere Blut gelangen " abhängen.

Möglicherweise lassen sich bezüglich der Thymidylat-Synthetase ähnliche Zusammenhänge anführen. Es zeigte sich nämlich, daß die - gegenüber Markzellen - deutlich verminderten Enzymaktivitäten in den peripheren Zellen bei akuten Leukämien nicht mit einer entsprechenden Reduzierung der Paraleukoblasten im Differentialblutbild einhergingen (Tab.10). Meist sogar differierte der im Blut bestimmte Paraleukoblastenanteil nur unerheblich von dem des Markes. Unter Zugrundelegung der von KILLMANN und WILMANNS vertretenen Annahme ließe sich die fehlende Übereinstimmung zwischen Differentialblutbild und enzymchemischen Befunden dadurch erklären, daß der periphere Paraleukoblastenanteil sich vorwiegend aus nicht proliferierenden Zellen, die zur DNS-Synthese nicht mehr oder nur noch ungenügend fähig sind, zusammensetzt.
Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten hat gezeigt, daß weder peripher noch im Mark eine signifikante Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der Paraleukoblasten und den gefundenen Enzymaktivitäten besteht. Dies mag vielleicht ebenfalls im Sinne der oben dargelegten Auffassung verstanden werden, indem das Verhältnis von teilungsfähigen zu nicht mehr teilungsfähigen Paraleukoblasten im Blut und im Mark variiert.

SILBER und Mitarbeiter, die periphere Zellen untersuchten, bezeichneten die Paraleukoblasten bei akuten Leukämien aus enzymchemischer Sicht als "heterogen" (67). So konnten sie in diesen Zellen, im Vergleich zu unreifen Zellen bei chronischen Myelosen, eine nur geringe Aktivität der Thymidylat-Synthetase feststellen. Bei einigen Patienten jedoch vermochten sie die Thymidylat-Synthetase überhaupt nicht nachzuweisen, obwohl bei zwei dieser Patienten 97 % bzw. 100 % Paraleukoblasten ausdifferenziert worden waren. Hier erhebt sich die Frage, ob nicht in diesen Fällen der hohe Prozentsatz an Paraleukoblasten nur aus nicht mehr teilungsfähigen Endformen bestanden hat. Eigene Untersuchungen erbrachten

in den Paraleukoblasten des Blutes jedoch stets den Nachweis einer Thymidylat-Synthetaseaktivität, die deutlich über der in normalen Leukocyten lag.

Derartig unterschiedliche Ergebnisse bei akuten Leukämien, wie sie von letzteren Autoren mitgeteilt wurden, sind auch schon bei in vitro-Versuchen des ^{14}C-Formaldehyd- (SCOTT, ASTALDI) bzw. Thymidin-^{3}H-Einbaus (CRADDOCK und NAKAI, KILLMANN) in die DNS intakter Paraleukoblasten beobachtet worden. Die besonders niedrige Einbaurate dieser Zellen beruht auf einem verminderten Thymidylat- bzw. DNS-Umsatz. Diesen autoradiographischen Untersuchungen zufolge wurde eine verlängerte Lebensdauer und eine herabgesetzte Teilungstendenz (77) der Paraleukoblasten angenommen.
Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen an unreifen Zellen bei chronischen Myelosen gesteigerte Einbauraten (^{14}C-Formiat (WELLS, SCOTT), ^{14}C-Formaldehyd (SCOTT, ASTALDI), Thymidin-^{3}H (CRADDOCK und NAKAI, KILLMANN)), sowie einen erhöhten Mitose-Index (3,25). Diesen Befunden entsprachen auch die Ergebnisse von SILBER et al., die bei chronischen Myelosen die höchsten spezifischen Thymidylat-Synthetaseaktivitäten fanden.

6. Enzymaktivitätsbestimmungen als Therapiekontrolle.

Die Möglichkeit, mit Hilfe von Enzymaktivitätsbestimmungen therapeutische oder auch toxische Wirkungen während einer cytostatischen Behandlung zu beurteilen, wird anhand der Abbildungen 23-27 diskutiert. Es kommt hierbei weniger auf einmalig festgestellte Absolutwerte,als vielmehr auf die im Verlaufe der Therapie bzw. eines bestimmten Zeitabschnitts erreichte relative Aktivitätsänderung an. Die biochemischen Befunde können als verhältnismäßig feine Indikatoren für mögliche Remissionen bzw. toxische Nebenerscheinungen gelten, erfüllen aber am geeignetsten ihren

Zweck in Verbindung mit klinischen und hämatologischen Untersuchungen.

Bei der Behandlung von chronischen Myelosen mit Cytostatica oder Röntgenbestrahlung der Milz fiel schon frühzeitig ein erheblicher Abfall der Thymidylat-Synthetaseaktivität in den peripheren myeloischen Vorstufen auf, während sich der relative Anteil dieser Zellen im Differentialblutbild zuerst nur geringfügig verminderte (Abb.23 und 24). Diese anfänglich fehlende Korrelation zwischen biochemischen und morphologischen Befunden kann dahingehend gedeutet werden, daß im Beginn der cytostatischen Therapie weniger die Zellzahl, als vielmehr das Verhältnis von proliferierenden zu nicht mehr proliferationsfähigen Zellen zugunsten letzterer verändert wurde. Im weiteren Verlauf jedoch wirkte sich der cytostatische Effekt auch morphologisch erkennbar aus (steiler Abfall des prozentualen Vorstufenanteils). Die frühzeitige Hemmung der DNS-Synthetse in leukämischen Zellen unter cytostatischer Therapie kam auch in den Untersuchungen über die DNS-Polymerase zum Ausdruck (WILMS und JAENICKE, 1968 (80)).

Die bei Pat. Me. (akute Leukämie, Abb.25) während der cytostatischen Therapie bestimmten Enzymaktivitäten zeigten anfangs keine Übereinstimmung mit der hämatologischen Remissionstendenz. Vor Beginn der Behandlung enthielt das periphere Blut einen hohen Prozentsatz an Paraleukoblasten bei relativ niedriger Thymidylat-Synthetaseaktivität. Man wird daher annehmen müssen, daß es sich bei diesen Zellen vorwiegend um nicht mehr teilungsfähige Blasten handelte. Unter dem Einfluß der eingesetzten Cytostatica war jedoch ein umgekehrtes Verhalten zu beobachten. Die Gesamtleukocytenzahl (200 000/mm^3) und auch der prozentuale Blastenanteil (88 %) fielen während der Chemotherapie auf 13 000/mm^3 bzw. 28 % ab. Die Enzymaktivität änderte sich jedoch nicht im Sinne des starken Zellabfalls, sondern stieg in den ersten Tagen von einem nur geringgradig er-

höhten Wert auf das Fünffache an, um dann allerdings wieder genau so steil abzufallen.
Da bisher keine Faktoren bekannt sind, die, durch Cytostatica angeregt, die Thymidylat-Synthetase aktivieren, ist ursächlich für den zuerst erfolgten Anstieg der Enzymaktivität, bei gleichzeitigem Abfall der Zellzahl, eine partielle Synchronisation der Zellen in der DNS-Synthesephase oder eine Selektion vorwiegend teilungsfähiger Paraleukoblasten anzunehmen. Die im weiteren Verlauf der Behandlung beobachtete Hemmung des Enzyms muß hierzu nicht unbedingt im Widerspruch stehen, sondern kann auch auf die stetige Verringerung des prozentualen Blastenanteils zurückgeführt werden.

Wiederholt durchgeführte Enzymaktivitätsbestimmungen im Verlauf einer chemotherapeutischen Behandlung sind einerseits geeignet, die Wirkung von cytostatischen Substanzen auf pathologisch veränderte weiße Blutzellen zu verfolgen, können andererseits aber auch dazu dienen, cytotoxische Nebenwirkungen auf normale Knochenmarkzellen zu erfassen und zu kontrollieren.
Bei Pat. Fr. konnte gezeigt werden, daß das zur Behandlung eines Rectum-Carcinoms injizierte 5-Fluor-Uracil schon nach kurzer Zeit zu cytotoxischen Erscheinungen im Knochenmark führte, ersichtlich an der Reduzierung myeloischer Vorstufen, vor allem aber an dem beachtlichen Abfall der Thymidylat-Synthetaseaktivität in diesen Zellen (Abb.26 und Tab.15). Bemerkenswert ist, besonders in Abb.26, daß die Hemmung des Enzyms relativ viel stärker war als die Verminderung des Vorstufenanteils.
Die Bestimmung der Thymidylat-Synthetaseaktivität in normalen Knochenmarkzellen bietet somit eine gute Möglichkeit, frühzeitig die Wirksamkeit einer cytostatischen Behandlung festzustellen.

Bei perniziösen Anämien konnten relativ hohe Thymidylat-Synthetaseaktivitäten in den Knochenmarkzellen nachgewiesen werden. Bei Vo. war die Aktivität des Enzyms sogar deutlich

höher als in leukämischen Markzellen (Tab.13).
Im Rahmen einer Behandlung dieser megaloblastären Anämien mit Vitamin B_{12} können routinemäßig durchgeführte Enzym=aktivitätsbestimmungen sinnvoll sein, da sich aus abfallen=den Aktivitäten Rückschlüsse auf die Kompensation des Mangel=zustandes ableiten lassen. Dieser Befund wurde bereits von WILMANNS (15), der vor und nach Vitamin B_{12}-Injektion die Aktivität der Thymidin-Kinase im megaloblastären Knochen=mark bestimmte, mitgeteilt.

Der bei der Entstehung von Riesenbakterien (E.coli-Mutanten) (COHEN und BARNER (23), BECK (4)) sowie von Megaloblasten und granulopoetischen Makroformen zugrunde liegende B_{12}-Mangel führt zu einer erheblichen Störung des Kernstoff=wechsels (DNS). Die Folge sind eine herabgesetzte Teilungs=tendenz und verzögerte Reifungsvorgänge. Da aber die RNS-Synthese vergleichsweise wenig oder überhaupt nicht in Mit=leidenschaft gezogen ist, besteht auch weiterhin ein Protein=umsatz und damit ein Zellwachstum, wobei letzteres jedoch unkontrolliert abläuft (4).
Einen direkten Einfluß auf die DNS-Biosynthese scheint Vita=min B_{12} durch seine Beteiligung an der Reduktion der Ribo=nucleotide zu den für die DNS erforderlichen Desoxyribo=nucleotiden zu nehmen (12). Ferner ist Vitamin B_{12} bei der Methioninsynthese beteiligt (34). Die bei dieser Reaktion freiwerdende FH_4 (aus N^5-Methyl-FH_4, der Hauptspeicherform der Folsäure im Organismus (26,40)) ist einerseits als Cofaktor für die Aktivierung von Einkohlenstoffeinheiten und deren Übertragung auf Purinnucleotide unentbehrlich und wird andererseits in Substratkonzentrationen bei der Methylierung von dUMP zu dTMP benötigt (13,58). Somit beeinflußt Vita=min B_{12} auch indirekt, nämlich über die Bereitstellung von FH_4, die DNS-Synthese.
Es ist anzunehmen, daß es in vivo bei Vitamin B_{12}-Mangel zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Stillstand der Thymin=methylgruppen-de novo-Synthese in den Knochenmarkzellen

kommt, offenbar weil weder dUMP noch FH_4, die beiden Substrate der Thymidylat-Synthetase, in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Die Untersuchungen an Cytolysaten von Knochenmarkzellen bei Perniziosa-Kranken ergaben den Nachweis einer aktiven Thymidylat-Synthetase, da dem Enzym die in vivo mangelnden Substrate dUMP (direkter Einfluß von B_{12}) und FH_4 (indirekter Einfluß von B_{12}) in den Inkubationsansätzen zugeführt wurden.

Aus den relativ hohen Aktivitätswerten der Thymidylat-Synthetase kann geschlossen werden, daß die untersuchten Markzellen vorwiegend aus noch jungen Vorstufen bestanden, bei denen in vivo weitere Reifungsteilungen ausgeblieben sind. Als Folge der Vitamin B_{12}-Therapie (Cytobion), unter der im Stoffwechsel die Bereitstellung von Tetrahydrofolsäure und Desoxyribosederivaten wieder geschieht, reifen die undifferenzierten Zellformen in kurzer Zeit zu funktionell vollwertigen Granulo- bzw. Erythrocyten (Retikulocytenanstieg !) heran und werden ins Blut ausgeschleust.
Wie aus Abb.27 ersichtlich ist, fiel die Thymidylat-Synthetaseaktivität im Knochenmark nach der B_{12}-Injektion (1000 µg i.m.) sogar weit unter die in normalen Markzellen gefundenen Werte ab. Die innerhalb weniger Tage stark abgefallene Enzymaktivität deutet darauf hin, daß in diesem Stadium die im Knochenmark befindlichen Zellen die unterbliebenen Teilungen und Reifungsprozesse größtenteils nachgeholt haben und somit im weiteren Verlauf rasch zur Kompensation der zellarmen Peripherie eingesetzt werden können.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Thymidylat-Synthetase wird in Cytolysaten von normalen und pathologischen, insbesondere leukämischen weißen Blut- und Knochenmarkzellen untersucht. Die Aktivitätsbestimmungen beruhen auf einem bei der Thymidylat-Synthetasereaktion erfolgenden Austausch des Tritiumatoms (von dUMP--5-^{3}H) gegen die sich an derselben Stelle des Uracilrings bildende Methylgruppe (von ^{5}N, ^{10}N-methylen-FH_4). Die Austauschrate des Tritiums stellt ein spezifisches Maß für die Enzymaktivität bzw. die Neusynthese von Thyminmethylgruppen dar.

2. Die Cytolysate können in gefrorenem Zustand (-15°C) 3-4 Tage ohne nennenswerte Inaktivierung aufbewahrt werden. Das Enzym reagiert bei pH = 7,2 (TRIS-Puffer) optimal. Absolut erforderlich für den Reaktionsablauf sind dUMP sowie FH_4 und Formaldehyd (bzw. Methylen-FH_4). Mg^{++}-Ionen und auch 2-Mercaptoäthanol erweisen sich als stark enzymaktivierende Komponenten im Ansatzgemisch. Der Zusatz von $NADPH+H^{+}$ geht ebenfalls mit einer erheblichen Enzymaktivitätssteigerung einher.

3. Der Substratumsatz verläuft über 150-180 min. linear und kommt nach 4 Stunden zum Stillstand. Die gebildete Menge dTMP verhält sich proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration. Die Affinität von dUMP zum Enzym (K_m = 5-6 x 10^{-5}M) ist etwa doppelt so groß wie die von FH_4 (K_m = 1,2 bzw. 1,3 x 10^{-4} M).

4. Von den 5-Fluor-Uracilderivaten erweist sich 5-F-dUMP (K_i = 1,5 x 10^{-8}M) als der stärkste Inhibitor der Thymidylat-Synthetase, während 5-F-Uracil und 5-F-dUR weniger effektiv sind. Die Enzymhemmung ist kompetitiv zu dUMP, jedoch nicht kompetitiv zu FH_4. Das Produkt der Substratmethylierung (dTMP) setzt erst in unphysiologisch hoher Konzentration (10^{-4}M) die Bildung zusätzlichen Thymidylats wirk-

sam herab. Methotrexat, ein Folsäureantagonist, ist nur in Gegenwart eines aktiven Folat-Reductasesystems bzw. bei Zusatz von $NADPH+H^+$ wirksam.

5. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgen an peripheren weißen Blutzellen bzw. an Knochenmarkzellen von 21 Patienten mit normalen hämatologischen Befunden, 43 Patienten mit akuten und chronischen Leukämien (darunter 2 akute Erythroleukämien und 8 chronische Lymphadenosen), 4 Patienten mit perniziösen Anämien und 1 Patientin mit Osteomyelofibrosklerose. Eine signifikante Korrelation zwischen biochemischen Veränderungen (Enzymaktivität) und morphologischen Eigenschaften (% myeloische Vorstufen) besteht lediglich für normale Knochenmarkzellen sowie für Markzellen bei chronischen Myelosen. Die spezifischen Thymidylat-Synthetaseaktivitäten sind im Vergleich zu anderen Enzymen des Folsäure-"C_1"-Stoffwechsels um ein Vielfaches niedriger.

6. In ausgereiften Leukocyten und in Lymphocyten bei chronischen Lymphadenosen sind nur minimale Synthetaseaktivitäten nachweisbar. Dagegen finden sich in unreifen myeloischen Zellen des Blutes bei akuten und chronischen Leukämien deutlich erhöhte, bei Osteomyelofibrosklerosen extrem gesteigerte Aktivitäten. Bemerkenswert ist, daß die Enzymaktivitäten in den Markzellen bei Leukämien stets erheblich höher gefunden werden als in den peripheren leukämischen Zellen. Im Durchschnitt fast ebenso hohe Aktivitäten werden in normalen bzw. regenerierenden Leukocytenvorstufen gemessen, woraus ersichtlich ist, daß ein erhöhter dUMP-Umsatz nicht nur für Leukämiezellen, sondern für alle unreifen, also auch für normale noch undifferenzierte Zellen kennzeichnend ist.

7. Die Bestimmung der Thymidylat-Synthetaseaktivität erlaubt Rückschlüsse auf therapeutische und auch toxische Wirkungen während einer cytostatischen Behandlung, wobei es weniger auf einmalig festgestellte Aktivitätswerte, als vielmehr auf die im Verlauf eines bestimmten Zeitabschnitts erreichte relative Aktivitätsänderung ankommt.

Pat.	$x - \bar{x}$	$y - \bar{y}$	$(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})$	$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y})^2$
Za.	- 6,75	- 4,97	+ 33,55	45,56	24,70
Ko.	- 10,75	- 1,80	+ 19,35	115,56	3,24
Da.	+ 20,25	+ 7,15	+ 144,79	410,06	51,12
Kl.	- 3,75	- 1,15	+ 4,31	14,06	1,32
Ba.	+ 9,25	+ 0,10	+ 0,92	85,56	0,01
Ha.	- 4,75	- 4,40	+ 20,90	22,56	19,36
Mey.	- 11,75	- 3,20	+ 37,60	138,06	10,24
Ku.	+ 7,25	+ 8,90	+ 64,52	52,56	79,21
Fr.	+ 19,25	+ 2,70	+ 51,97	370,56	7,29
Hi.	+ 11,25	+ 2,40	+ 27,00	126,56	5,76
We.	- 18,75	- 5,10	+ 95,62	351,56	26,01
Met.	- 10,75	- 0,40	+ 4,30	115,56	0,16
Summe:			504,83	1848,22	228,42

$$r = \frac{(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{504,83}{228,42 \cdot 1848,22} = \frac{504,83}{649,7} = 0,777$$

r = Korrelationskoeffizient, Zufallshöchstwert von r für N-2 Freiheitsgrade (N-2=10) bei 1 % Überschreitungswahrscheinlichkeit= 0,7079 (tabellarisch entnommener Wert).

Mittelwerte : $\bar{x} = 28,75$ N = 12 $p < 0,01$

$\bar{y} = 16,1$

ANHANG

Tab.Ia: Statistische Berechnung der Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthetase= aktivität (y) und dem prozentualen Anteil der Vorstufen im Mark (x) bei 12 Patienten mit normalen Zellen aus Tabelle 12 .

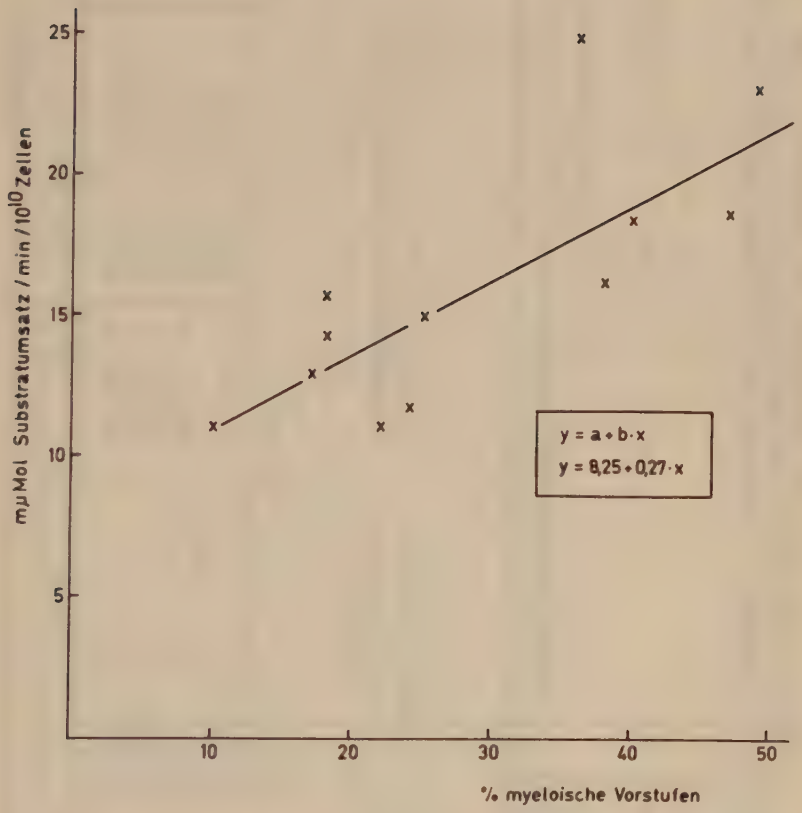

Abb.Ib: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthetaseaktivität (mμMol Substratum= satz/min./10^{10} Zellen) und dem prozentualen Anteil nicht leukämischer Knochenmarkzellen bei 12 Patien= ten. (Weiße Vorstufen s. Tab.12 .)

Pat.	$x - \bar{x}$	$y - \bar{y}$	$(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})$		$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y})^2$
Ei.	- 12,33	- 2,57	+ 31,69		152,03	6,60
Kr.	- 16,33	- 6,70	+ 109,41		266,67	44,89
Ju.	+ 48,67	+ 11,90	+ 579,17		2368,77	141,61
Po.	+ 0,67	+ 1,50	+ 1,10		0,45	2,25
Ho.	- 2,33	+ 1,40		- 3,26	5,43	1,96
Fl.	- 18,33	- 5,30	+ 97,15		335,99	28,09
Summe:			815,26		3129,34	225,40

$$r = \frac{(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \cdot \sum(y - \bar{y})^2}} = \frac{815,26}{225,40 \cdot 3129,34} = \frac{815,26}{839,85} = 0,970$$

r = Korrelationskoeffizient, Zufallshöchstwert von r für N-2 Freiheitsgrade (N-2 = 4) bei 1 % Überschreitungswahrscheinlichkeit = 0,9172 (tabellarisch entnommener Wert).

Mittelwerte : $\bar{x} = 49,33$ $\quad N = 6$ $\quad p < 0,01$

$\bar{y} = 18,1$

Tab.IIa: Statistische Berechnung der Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthetase-aktivität (y) und dem prozentualen Anteil myeloischer Vorstufen im Mark (x) bei 6 Patienten mit chronischen Myelosen aus Tabelle 11.

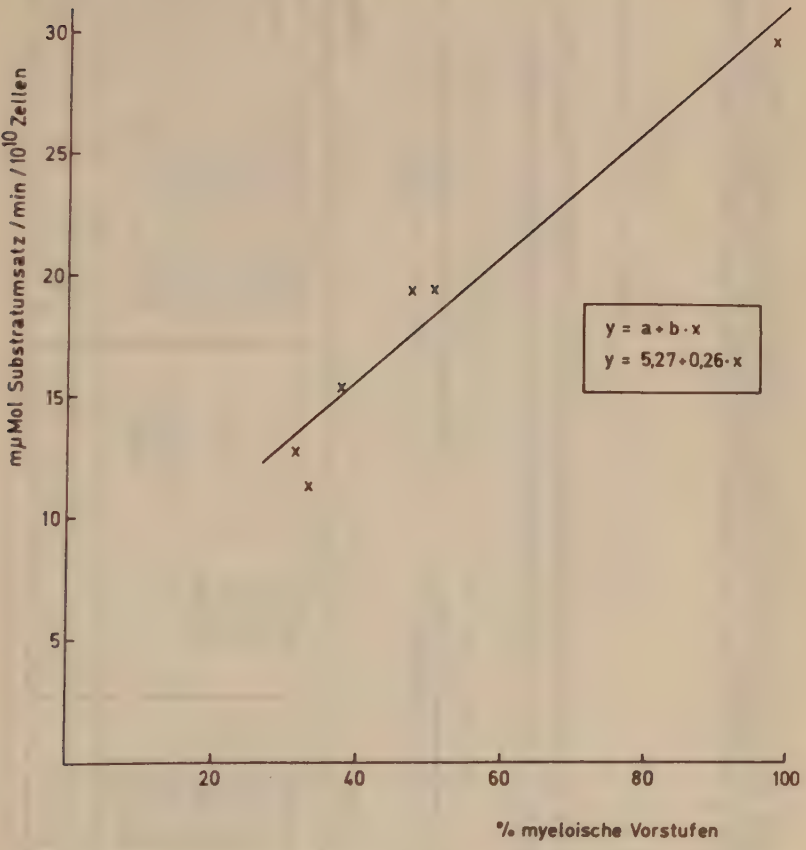

Abb.IIb: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthetaseaktivität (mμMol Substratum= satz/min./10^{10} Zellen) und dem prozentualen Anteil myeloischer Vorstufen im Mark bei 6 Patienten mit chronischen Myelosen aus Tabelle 11 . (Weiße Vor= stufen s.Tab.11 .)

Pat.	$x - \bar{x}$	$y - \bar{y}$	$(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})$		$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y})^2$
Ei.	- 14,75	- 2,24	+ 33,04		217,56	5,02
Kr.	- 31,75	- 3,82	+ 120,58		1008,06	14,59
Ju.	+ 4,72	+ 0,03	+ 0,14		22,32	0,00
Po.	- 15,75	+ 1,78		- 28,03	248,06	3,17
Ho.	- 11,75	+ 4,63		- 54,40	138,06	21,44
Sa.	- 27,75	+ 3,33		- 92,41	770,06	11,09
Scha.	+ 45,24	- 2,3		- 104,07	2047,56	5,29
Ko.	+ 9,25	- 1,39		- 12,86	85,56	1,93
Summe:				- 138,0	4537,24	62,53

$$r = \frac{(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{-138,0}{62,53 \cdot 4537,24} = \frac{-138,0}{532,65} = -0,259$$

r = Korrelationskoeffizient, Zufallshöchstwert von r für N-2 Freiheitsgrade (N-2=6) bei 5 % Überschreitungswahrscheinlichkeit= 0,7067 (tabellarisch entnommener Wert).

Mittelwerte : $\bar{x} = 39,75$ $\quad N = 8$ $\quad p > 0,05$

$\bar{y} = 7,42$

Tab.III: Statistische Berechnung der Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthetase= aktivität (y) und dem prozentualen Anteil myeloischer Vorstufen im peripheren Blut (x) bei 8 Patienten mit chronischen Myelosen aus Tabelle 11 .

Pat.	$x - \bar{x}$	$y - \bar{y}$	$(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})$	$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y})^2$
Schr.	+ 11	+ 6,11	+ 67,21	121	37,33
Ro.	+ 2	- 8,15	- 16,30	4	66,42
Mas.	- 10	- 4,11	+ 41,10	100	16,89
Me.	+ 7	- 8,81	- 61,67	49	77,62
Be.	+ 7	+ 1,39	+ 9,73	49	1,93
Re.	- 12	+ 8,75	- 104,88	144	76,56
Ki.	- 15	- 3,41	+ 51,15	225	11,63
Mau.	+ 10	+ 8,24	+ 82,40	100	67,88
Summe:			68,74	792	356,25

$$r = \frac{(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{68,74}{356,25 \cdot 792} = \frac{68,74}{531,2} = 0,129$$

r = Korrelationskoeffizient, Zufallshöchstwert von r für N-2 Freiheitsgrade (N-2=6) bei 5 % Überschreitungswahrscheinlichkeit = 0,7067 (tabellarisch entnommener Wert).

Mittelwerte : $\bar{x} = 88$ $\quad N = 8$ $\quad p > 0,05$

$\bar{y} = 21,01$

Tab.IV: Statistische Berechnung der Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthetase= aktivität (y) und dem prozentualen Anteil der Paraleukoblasten im Mark (x) bei 8 Patienten mit akuten Leukämien aus Tabelle 10 .

Pat.	$x - \bar{x}$	$y - \bar{y}$	$(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})$	$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y})^2$
Schr.	+ 36,64	+ 5,98	+ 219,11	1342,49	35,76
Ro.	+ 20,64	- 3,84	- 79,26	426,01	14,74
Ma.	- 43,36	- 3,62	+ 156,96	1880,09	13,10
Me.	+ 18,64	- 3,35	- 62,44	347,45	11,22
Be.	+ 15,64	- 0,22	- 3,44	244,61	0,05
Re.	+ 15,64	+ 3,53	+ 55,21	244,61	12,46
La.	+ 41,64	- 2,02	- 84,11	1733,89	4,08
Lo.	+ 4,64	+ 3,98	+ 18,46	21,52	15,84
Br.	- 35,36	- 0,77	+ 27,23	1250,33	0,59
Ep.	- 36,36	+ 0,68	- 24,72	1322,05	0,46
Bu.	+ 33,64	- 0,38	- 12,78	1131,65	0,14
Summe :			210,22	9944,70	108,44

$$r = \frac{(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{210,22}{108,44 \cdot 9944,70} = \frac{210,22}{1038,5} = 0,202$$

r = Korrelationskoeffizient, Zufallshöchstwert von r für N-2 Freiheitsgrade (N-2=9) bei 5% Überschreitungswahrscheinlichkeit= 0,6021 (tabellar.entnommener Wert).

Mittelwerte : $\bar{x} = 56,36$ N = 11 $p > 0,05$

$\bar{y} = 6,22$

Tab.V: Statistische Berechnung der Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthetase= aktivität (y) und dem prozentualen Anteil der Paraleukoblasten im peripheren Blut (x) bei 11 Patienten mit akuten Leukämien aus Tabelle 10 .

L I T E R A T U R

1. ACKERMANN, W.W. and V.R. POTTER: Enzyme inhibition in relation to chemotherapy. Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 72, 1-9 (1949).

2. ALEXANDER, N. and D.M. GREENBERG: Studies on the purification and properties of the serine-forming enzyme system. J.biol.Chem. 220, 775 (1956).

3. ASTALDI, G.: Differentiation, proliferation and maturation of haemopoietic cells studied in tissue culture in Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis. In: G.E.W. WOLSTENHOLME and M.O'CONNOR (eds.) Boston: Little, Brown & Co., p.99, 1960.

4. BECK, W.S.: The metabolic function of vitamin B_{12}. New Engl. J.Med. 266, 765 (1962).

5. BERTINO, J.R.: The mechanism of action of folate antagonists in man. Cancer Res. 23, 1286-1306 (1963).

6. BERTINO, J.R., D.M. DONOHUE, B.W. GABRIO, R. SILBER and F.M. HUENNEKENS: The induction of dihydrofolic reductase activity in leucocytes and erythrocytes of patients treated with amethopterin. J.clin.Invest. 42, 466-475 (1962).

7. BIANCHI, P.A.: Thymidine phosphorylation and deoxyribonucleic acid synthesis in human leucemic cells. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 55, 547 (1962).

8. BIANCHI, P.A., J.A.V. BUTLER, A.R. CRATHORN and K.V. SHOOTER: The thymidine phosphorylating kinase. Biochem.biophys.Acta (Amst.) 53, 123-131 (1961).

9. BIRNIE, G.D. and C. HEIDELBERGER: In vitro synthesis of acid-soluble thymine compounds by human neoplastic tissues. Cancer Res. 23, 420-430 (1963).

10. BLAKLEY, R.L.: Cristalline dihydropteroylglutamic acid. Nature (Lond.) 40, 1684 (1961).

11. BLAKLEY, R.L.: The biosynthesis of thymidylic acid. IV. Further studies on thymidylate synthetase. J.biol.Chem. 238, 2113-2118 (1963).

12. BLAKLEY, R.L.: Cobamides and ribonucleotide reduction. I. Cobamide stimulation of ribonucleotide reduction in extracts of Lactobacillus leichmannii. J.biol.Chem. 240, 2173-2180 (1965).

13. BLAKLEY, R.L. and B.M. McDOUGALL: The biosynthesis of thymidylic acid. II. Purification of thymidylate synthetase and its spectrophotometric assay. J.biol.Chem. 237, 812-818 (1962).

14. BOCK, H.E.: Das Hämomyelogramm Klin.Wschr. 18, 1565-1568 (1939).

15. BOCK, H.E., J. HARTJE, D. MÜLLER und W. WILMANNS: Thyminnucleotid-Synthese und Proliferation von Knochenmarkzellen bei megaloblastären Anämien unter der Einwirkung von Vitamin B_{12}. Klin.Wschr. 45, 176-188 (1967).

16. BOSCH, L., E. HARBERS and C. HEIDELBERGER: Studies on fluorinated pyrimidines. V. Effects on nucleic acid metabolism in vitro. Cancer Res. 18, 335-343 (1958).

17. BREITMAN, T.R.: The feed back inhibition of thymidine kinase. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 67, 153-155 (1963).

18. BRESNICK, E. and R.J. KARJALA: Endproduct inhibition of thymidine kinase activity in normal and leucemic leucocytes. Cancer Res. 24, 841-846 (1964).

19. BROCK, N. und H.J. HOHORST: In H. WILMANNS: Chemotherapie maligner Tumoren. Stuttgart: Schattauer 1964.

20. BÜCHER, T.: Über ein Phosphat-übertragendes Gärungsferment. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 1, 292-314 (1948).

21. CHAUDHURI, N.K., B.J. MONTAG and C. HEIDELBERGER: Studies on fluorinated pyrimidines. III. The metabolism of 5-fluorouracil--2-^{14}C and 5-fluoroorotic-2-^{14}C-acid in vivo. Cancer Res. 18, 318-328 (1958).

22. COHEN, S.S.: Studies on the induction of thymine deficiency and on the effects of thymine and thymidine analogues in Escherichia coli. J.Bacteriol. 71, 588-597 (1956).

23. COHEN, S.S. and H.D. BARNER: Studies on unbalanced growth in Escherichia coli. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 50, 885 (1954).

24. COHEN, S.S., J.G. FLAKS, H.D. BARNER, M. LOEB and J. LICHTENSTEIN: The mode of action of 5-fluorouracil and its derivates. Proc.nat.Acad.Sci. 44, 1004-1012 (1958).

25. CRADDOCK, C.G. and G.S. NAKAI: Leucemic cell proliferation as determined by an in vitro deoxyribo= nucleic acid synthesis. J.clin.Invest. 41, 360-369 (1962).

26. DONALDSON, K.O. and J.C. KERESZTESY: The interconversion of Prefolic A and tetrahydrofolic acid. Fed.Proc. 20, 453 (1961).

27. FLAKS, J.G. and S.S. COHEN: Virus-induced acquisition of metabolic function. III. Formation and some properties of thymidylate synthetase of bacteriophage-infected Escherichia coli. J.biol.Chem. 234, 2981-2986 (1959).

28. FRIEDKIN, M.: The transfer of ^{3}H from triated tetrahydrofolic acid to thymidylic acid. Fed.Proc. 18, 1031 (1957).

29. FRIEDKIN, M.: Assay of thymidylate synthetase activity. In: S.P.COLOWICK and N.O.KAPLAN (eds.), Methods in enzymology, Vol.VI, pp. 124-130. New York: Academic Press, 1963.

30. FRIEDKIN, M. and A. KORNBERG: The enzymatic conversion of deoxy= uridylic to thymidylic acid and the participation of tetrahydrofolic acid. In: W.D.McELROY and B.GLASS (eds.), The chemical bases of heredity, pp. 609-614. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1957.

31. FUTTERMANN, S.: Enzymatic reduction of folic acid and dihydrofolic acid to tetrahydro= folic acid. J.biol.Chem. 228, 1031-1038 (1957).

32. GREENBERG, D.M., L.I. MALKIN and R. NATH: Structural requirements for the serin aldolase and the thymidylate synthe= tase reactions. Biochem.biophys.Res.Commun. 3, 603-606 (1960).

33. GREENBERG, D.M., R. NATH and G.K. HUMPHREYS: Purification and properties of thymi= dylate synthetase from calf thymus. J.biol.Chem. 236, 2271-2276 (1961).

34. GUEST, J.R. and D.D. WOODS: Metabolic interrelation ships between cobalamin and folic acid in the syn= thesis of methionin by Escherichia coli. In: H.HEINRICH, Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor. Stuttgart: Ferdinand Enke 1962.

35. HÄGGMARK, A.: Studies on resistance against 5-fluorouracil. II. Thymidylate synthe= tase from drug-resistant tumor lines. Cancer Res. 22, 568-572 (1962).

36. HARBERS, H., G.F. DOMAGK und W. MÜLLER: Die Nucleinsäuren. 1.Aufl. Stuttgart: Thieme 1964.

37. HARTMANN, K.-U. and C. HEIDELBERGER: Studies on fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidylate synthetase. J.biol.Chem. 236, 3006-3013 (1961).

38. HEIDELBERGER, C., K.C. LEIBMAN, E. HARBERS and P.M. BHARGAVA: The comparative utilization of uracil-2-^{14}C by liver, intestinal mucosa, and Flexner-Jobling-carcinoma in the rat. Cancer Res. 17, 399-404 (1957).

39. HEIDELBERGER, C., A. GHOBAR, R.K. BAKER and K.L. MUKHERJEE: Studies on fluorinated pyrimidines. X. In vivo studies on tumor resistance. Cancer Res. 20, 897-902 (1960).

40. HERBERT, V.: The assay and nature of folic activity in human serum. J.clin.Invest. 40, 81 (1961).

41. HOLLAND, W.C., R.L. KLEIN und A.H. BRIGGS: Molekulare Pharmakologie. Stuttgart: Thieme 1967.

42. IVES, D.H., P.A. MORSE and V.R. POTTER: Feed back inhibition of thymidine kinase by thymidine triphosphate. J.biol.Chem. 238, 1467-1474 (1963).

43. JAENICKE, L.: Conversion of ß-carbon of serine to N^{10}-formyl-tetrahydrofolic acid. Fed.Proc. 15, 281 (1956).

44. JAENICKE, L. und E. BRODE: Untersuchungen über Einkohlenstoffkörper. I. Die Tetrahydrofolat-Formylase aus Taubenleber. Reinigung und Mechanismus. Biochem.Z. 334, 108-132 (1961).

45. JAENICKE, L. und W. WILMANNS: Der Stoffwechsel der Folsäure und der Einkohlenstoffeinheiten. Klin.Wschr. 41, 1029-1038 (1963).

46. JENNY, E. and D.M. GREENBERG: Further studies on thymidylate synthetase from calf thymus. J.biol.Chem. 238, 3378-3382 (1963).

47. KAMMEN, H.O.: A rapid assay of thymidylate synthetase. Anal.Biochem. 17, 553-556 (1966).

48. KILLMANN, S.A.: Proliferative activity of blast cells in leucemia and myelofibrosis. Acta med.scand. 178, 263-280 (1965).

49. KISLIUK, R.L.: Studies on the mechanism of formaldehyde incorporation into serine. J.biol.Chem. 227, 805 (1957).

50. KORNBERG, A.: Pathways of enzymatic synthesis of nucleotides and polynucleotides. In: W.D.McELROY and B.GLASS (eds.), The chemical bases of heredity, pp. 579-608. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1957.

51. LINEWEAVER, J.R.and D. BURK: The determination of enzyme dissociation constants. J.Amer.chem.Soc. 56, 658 (1934).

52. LOMAX SMITH,M.I.and G.R. GREENBERG: A new assay of thymidylate synthetase activity based on the release of tritium from deoxyuridylate-5-^{3}H. J.biol.Chem. 242, 109-113 (1967).

53. MALEY, F. and G.F. MALEY: On the nature of a sparing effect by thymidine on the utilization of deoxycytidin. Biochemistry, 1 , 847-851 (1962).

54. MATHEWS, C.K. and S.S. COHEN: Inhibition of phage-induced thymidylate synthetase by 5-fluorodeoxyuridylate. J.biol.Chem. 238, 367-370 (1963).

55. McDOUGALL, B.M. and R.L. BLAKLEY: The role of reduced diphosphopyridine nucleotide in the synthesis of thymidylic acid. Biochem.biophys.Acta, 39, 176-177 (1960).

56. McDOUGALL, B.M. and R.L. BLAKLEY: The biosynthesis of thymidylic acid. I. Preliminary studies with extracts of Streptococcus faecalis R. J.biol.Chem. 236, 832-837 (1961).

57. NICKERSON, W.J. and M. WEBB: Effect of folic acid analogues on the growth and cell division of non-exacting microorganisms. J.Bacteriol. 71, 129-139 (1956).

58. O'BRIEN, J.C.: The role of the folate coenzymes in cellular division. A review. Cancer Res. 22, 267-281 (1962).

59. O'DELL, B.L., J.M. VANDENBELT, E.S. BLOOM and J.J. PFIFFNER: Hydrogenation of vitamin B_c (pteroylglutamic acid) and related pteridines. J. Amer.chem.Soc. 69, 250 (1947).

60. PASTORE, E.J. and M. FRIEDKIN: The enzymatic synthesis of thymidylate. II. Transfer of tritium from tetrahydrofolate to the methyl group of thymidylate. J.biol.Chem. 237, 3802-3810 (1962).

61. POTTER, R.L. and O.F. NYAGAARD: The conversion of thymidine to thymine nucleotides and deoxyribonucleic acid in vivo. J.biol.Chem. 238, 2150-2155 (1963).

62. REICHARD, P., O. SKÖLD and G. KLEIN: Possible enzymic mechanisms for the development of resistance against fluorouracil in ascites tumors. Nature 183, 939-941 (1959).

63. ROBERTS, D.: An isotopic assay for thymidylate synthetase. Biochemistry, 5, 3546-3548 (1966).

64. ROBERTS, D. and F. FRIEDKIN: The fluorometric determination of thymine in deoxyribonucleic acid and derivates. J.biol.Chem. 233, 483-487 (1958).

65. SCOTT, J.L.: Human leucocyte metabolism in vitro. I. Incorporation of adenine-8-^{14}C and formate-^{14}C into the nucleic acids of leucemic leucocytes. J.clin.Invest. 41, 67 (1962).

66. SILBER, R., B.W. GABRIO and F.M. HUENNEKENS: Enzymatic synthesis of thymidylate by leucocytes. Clin.Res. 10, 207 (1962).

67. SILBER, R., B.W. GABRIO and F.M. HUENNEKENS: Studies on normal and leucemic leucocytes. VI. Thymidylate synthetase and deoxycytidylate deaminase. J.clin.Invest. 42, 1913-1921 (1963).

68. SMITH, M.I. and G.R. GREENBERG: Release of tritium from deoxyuridylate-5-^{3}H by Escherichia coli and phage-induced thymidylate synthetases. Fed.Proc. 23, 271 (1964).

69. WAHBA, A.J. and M. FRIEDKIN: Direct spectrophotometric evidence for the oxydation of the tetrahydrofolate during the enzymatic synthesis of thymidylate. J.biol.Chem. 236, PC 11-12 (1961).

70. WAHBA, A.J. and M. FRIEDKIN: The enzymatic synthesis of thymidylate. I. Early steps in the purification of thymidylate synthetase of Escherichia coli. J.biol.Chem. 237, 3794-3801 (1962).

71. WEISSMAN, S.M., R.M.S. SMELLIE and J. PAUL: Studies on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid by extracts of mammalian cells. IV. The phosphorylation of thymidine. Biochim.biophys.Acta 45, 101-110 (1960).

72. WELLS, W.: In vitro incorporation of formate into nucleic acid derivates of normal and leucemic human leucocytes. Ph.D.thesis, University of Illinois, 1959.

73. WELLS, W. and R.J. WINZLER: Metabolism of human leucocytes in vitro. III. Incorporation of formate-^{14}C into cellular components of leucemic human leucocytes. Cancer Res. 19, 1086-1090 (1959).

74. WERKHEISER, W.C.: Specific binding of 4-amino-folic acid analogues by folic acid reductase. J.biol.Chem. 236, 888-893 (1961).

75. WERKHEISER, W.C., S.F. ZAKRZEWSKI and C.A. NICHOL: Assay for 4-amino-folic analogues by inhibition of folic acid reductase. J.Pharmacol.exp.Ther. 317, 162-167 (1962).

76. WILMANNS, W.: Die Tetrahydrofolsäure-abhängige Aktivierung von Einkohlenstoffeinheiten in normalen und pathologischen weißen Blutzellen. Klin.Wschr. 39, 884-888 (1961).

77. WILMANNS, W.: Die Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. Klin.Wschr. 45, 505-511 (1967).

78. WILMANNS, W.: Biochemie normaler und leukämischer weißer Blutzellen. Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 5 , 233-241 (1967).

79. WILMANNS, W. und L. JAENICKE: Die Bedeutung des Folsäurestoffwechsels für die normale und pathologische Reifung von Blutzellen. Klin.Wschr. 41, 1077-1082 (1963).

80. WILMS, K. und L. JAENICKE: Desoxyribonucleinsäure-Polymerase in menschlichen Leukocyten. Enzymaktivität bei Leukämien und Virusinfektionen. Klin.Wschr. 46, 407-413 (1968).

81. WINZLER, R.J., A.D. WILLIAMS and W.R. BEST: Metabolism of human leucocytes in vitro. I. Effects of amethopterin on formate-^{14}C incorporation. Cancer Res. 17, 108 (1957).

82. ZAKRZEWSKI, S.F.: The mechanism of binding of folate analogues by folate reductase. J.biol.Chem. 238, 1485-1490 (1963).

Die Ausführung der vorliegenden Dissertation wurde mir in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen ermöglicht, wofür ich deren Direktor, Herrn Professor Dr.med. Dr.med.h.c. H.E. Bock, dankbar bin.

Herrn Dozent Dr.med.W. Wilmanns möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die stets gewährte freundliche Unterstützung bei deren Durchführung danken.

Außerdem gilt mein Dank den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau S.Gebauer und Fräulein E.Gengenbach, die mich in labortechnischen Fragen gut berieten.

Lebenslauf

Am 28. Oktober 1942 wurde ich, Volker Neef, als Sohn des Diplom-Ingenieurs Gerhard Neef und seiner Ehefrau Edith, geb. Hedrich, in Wien geboren. Als Wien 1944 evakuiert wurde, zog meine Familie nach Freudenstadt im Schwarz=wald. Dem Besuch der Volksschule folgte Ostern 1953 der Eintritt in das Kepler-Gymnasium in Freudenstadt. Da meine Eltern 1958 nach Nürtingen am Neckar zogen, wechselte ich an das dortige Gymnasium. An dieser Schule bestand ich im Frühjahr 1962 die Reifeprüfung. Im Juli 1962 wurde ich zur Ableistung des 18-monatigen Grundwehrdienstes eingezogen.

Im Sommersemester 1964 begann ich das Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, wo ich nach dem zweiten Semester die naturwissenschaftliche und nach dem fünften, im Herbst 1966, die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach einem klinischen Studium von weiteren sechs Semestern bestand ich im Februar 1970 an der Universität Tübingen das Medizinische Staatsexamen.